

**Der zweite Schritt der Molybdäncofaktor-Biosynthese:
Molekularer Mechanismus der Konversion
von PrecursorZ zu Molybdopterin**

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**genehmigte
D i s s e r t a t i o n**

**von Gerrit Gutzke
aus Braunschweig**

1. Referent: Prof. Dr. R. R. Mendel

2. Referent: Prof. Dr. J. Bode

eingereicht am: 04. April 2002

mündliche Prüfung abgelegt am: 14. Juni 2002

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

Gutzke G., Fischer B., Mendel R.R., Schwarz G.

Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem.* 2001 Sep 28; 276(39): 36268-74.

Tagungsbeiträge:

Gutzke G., Schwarz G., Mendel R.R.;

Molybdenum Cofactor Biosynthesis: Molecular Mechanism of Molybdopterin-Synthase Reaction; 12th International Conference on Pterins, Folates and Related Biogenic Amines; 18. - 25.03.2000

Gerrit Gutzke, Andrea Freuer, Ralf R.Mendel and Günter Schwarz;

Molecular Mechanism of MPT-Synthase Reaction, 2nd Gordon Research Conference on Molybdenum and Tungsten Enzymes; 01.07.2001 – 06.07.2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Molybdän in biologischen Systemen	1
1.2	Der Molybdäncofaktor	2
1.2.1	Die Struktur des Molybdäncofaktors	3
1.3	Die Biosynthese des Molybdäncofaktors	4
1.3.1	Biosynthese von PrecursorZ	5
1.3.2	Konversion von PrecursorZ zu MPT	8
1.3.3	Incorporation von Molybdän in Molybdopterin	10
1.4	Moco-Biosynthese in <i>Neurospora crassa</i>	14
2.	Ergebnisse	16
2.1	Funktionelle Charakterisierung der MPT-Synthase aus <i>E.coli</i>	16
2.1.1	Die schwefel-aktivierte Form der kleinen Untereinheit	17
2.1.1.1	Klonierung und Expression der kleinen Untereinheit Moad	17
2.1.1.2	Verifizierung des modifizierten C-Terminus von Moad	19
2.1.2	Klonierung und Expression der großen Untereinheit (MoaE) der <i>E.coli</i> MPT-Synthase	20
2.1.3	<i>In vitro</i> Assemblierung der bakteriellen MPT-Synthase aus separaten Untereinheiten	20
2.1.4	Aktivitätsuntersuchungen der bakteriellen MPT-Synthase	23
2.1.5	Massenspektroskopische Untersuchung der MPT-Synthase-Reaktion	25
2.1.6	Versuche zur Generierung einer heterodimeren MPT-Synthase	25
2.1.6.1	Native Gelelektrophorese der MPT-Synthase Untereinheiten und ihrer Komplexe	29
2.1.7	Spektroskopische Analyse der PrecursorZ Konversion	30
2.2	Untersuchungen zur Schwefelquelle der MPT-Synthase-Reaktion in <i>E.coli</i>	32
2.2.1	Charakterisierung einer <i>iscS</i> -Mutante	32
2.2.1.1	Untersuchungen der endogenen MPT-Synthase Aktivität der <i>iscS</i> -Mutante	33
2.2.1.2	Induktion der internen MPT-Synthase der <i>iscS</i> -Mutante	34
2.2.1.3	Expression der <i>E.coli</i> MPT-Synthase in der <i>iscS</i> -Mutante	35
2.2.1.4	Identifizierung eukaryontischer IscS Proteine	37
2.3	Charakterisierung der eukaryontischen MPT-Synthase Reaktion in <i>A.thaliana</i>	39
2.3.1	Komplementation von <i>E.coli</i> Mutanten des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese	39

2.3.1.1	Rekonstitution der Nitratreduktase in <i>E.coli</i> Mutanten	40
2.3.1.2	MPT-Messung komplementierter Mutanten	43
2.3.1.3	Reinigung überexprimierter pflanzlicher MPT-Synthase	44
2.3.2	<i>In vitro</i> Generierung aktivierter pflanzlicher MPT-Synthase	46
2.3.2.1	Klonierung und Expression von <i>cnx7</i>	46
2.3.2.2	Klonierung und Expression von <i>cnx6</i>	47
2.3.2.3	<i>In vitro</i> Assemblierung pflanzlicher MPT-Synthase	48
2.3.2.3.1	Gelfiltrations-Analyse von Cnx6, Cnx7 und assemblierter Komplexe	48
2.3.2.3.2	Komplexbildung einer chimären pflanzlich-bakteriellen MPT-Synthase	49
2.3.2.3	Aktivitätsbestimmung der pflanzlichen MPT-Synthase und pflanzlich-bakterieller MPT-Synthase Chimären	50
2.4	Die humane MPT-Synthase	52
2.4.1	Klonierung und Expression von <i>mocs2A</i>	52
2.4.2	Klonierung und Expression von <i>mocs2B</i>	53
2.4.3	Komplementation von <i>moaE</i> -Mutanten durch <i>mocs2B</i> Expression	54
2.4.4	<i>In vitro</i> Assemblierung und <i>in vitro</i> MPT-Synthase humaner MPT-Synthase und human-bakterieller Chimären	54
2.5	Aktivitätsvergleich der untersuchten MPT-Synthasen	56
2.6	Identifizierung von Mutanten des zweiten Moco-Biosynthese-Schritts	58
2.6.1	Chloratresistente Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
2.6.1.1	Klonierung von <i>cnx6</i> aus <i>A.thaliana ch15</i> und Sequenzvergleich mit dem Wildtyp	59
2.6.1.2	Phänotypvergleich der <i>ch15</i> -Mutante und des Wildtyps	60
2.6.2	Moco-Biosynthese in <i>Neurospora crassa</i>	62
2.6.2.1	Die <i>Neurospora crassa</i> Wildtyp-Proteine des zweiten Schrittes	62
2.6.2.1.1	Sequenz der kleinen MPT-Synthase Untereinheit	62
2.6.2.1.2	Sequenz der großen MPT-Synthase Untereinheit	63
2.6.2.1.3	Sequenz des MoeB homologen Proteins	64
2.6.3.2	Isolierung und Klonierung der Gene des zweiten Schritts aus <i>nit-1</i> und <i>nit-8</i> Mutanten	66
2.6.3.2.1	Sequenzanalyse der Gene des zweiten Schritts aus <i>nit-1</i> und <i>nit-8</i> Mutanten	67
2.6.3.2.2	Identifizierung der <i>nit-1</i> Mutation	67
2.6.3.2.3	Identifizierung der <i>nit-8</i> Mutation	69
3.	Diskussion	71
3.1	Die bakterielle MPT-Synthase	71
3.1.1	Die MPT-Synthase ist ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten	71

3.1.2	Die kleine Untereinheit der MPT-Synthase liegt in aktiver Form thiocarboxyliert vor	73
3.1.3	Funktionalität einer heterodimeren MPT-Synthase	74
3.1.4	Die Reaktion von PrecursorZ zu MPT	75
3.1.5	Die Schwefelquelle der MPT-Synthase Reaktion in <i>E.coli</i>	79
3.1.6	Modell des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in <i>E.coli</i>	82
3.2	Eukaryontische MPT-Synthasen	83
3.2.1	Mutanten-Komplementation	84
3.2.2	Aktivitätsmessungen eukaryontischer MPT-Synthase und bakterieller Chimären	86
3.2.3	Modell des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in Eukaryonten	87
3.3	Mutanten des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in Pflanzen und Pilzen	89
3.3.1	Die <i>chl-5</i> Mutante in <i>A.thaliana</i>	89
3.3.2	Die <i>N. crassa</i> Gene des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese und ihre Mutationen <i>nit-1</i> und <i>nit-8</i>	90
3.3.2.1	Die Mutation in <i>nit-1</i>	94
3.3.2.2	Die Mutation in <i>nit-8</i>	96
3.4	Bedeutung dieser Arbeit für die Aufklärung der MPT-Synthase	97
4.	Material und Methoden	99
4.1	Verwendete Chemikalien und Enzyme	99
4.2	Organismen und Stämme	99
4.2.1	Verwendete Plasmide	100
4.3	Molekularbiologische Arbeiten	100
4.3.1	Klonierungstechniken	100
4.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	101
4.3.2.1	PCR-Mutagenese	101
4.3.2.2	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	102
4.3.3	DNA-Sequenzierung	102
4.3.4	GPS-M Mutagenese System (New England Biolabs)	103
4.4	Proteinbiochemische Arbeiten	103
4.4.1	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i>	103
4.4.1.1	Aufreinigung von His-getaggten Proteinen	103
4.4.1.2	IMPACT™ CN-Intein-System	104
4.4.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	104
4.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	105
4.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	105

4.4.5	Native Gelelektrophorese	105
4.4.6	Immunblot-Analyse	105
4.4.7	Proteinsequenzierung	106
4.5	Analytische Methoden	107
4.5.1	Gelfiltration	107
4.5.2	Chemischer Nachweis von Intermediaten der Molybdäncofaktor-Biosynthese (FormA-Bestimmung)	107
4.5.3	Massen-Spektroskopie	109
4.5.3.1	Matrix- unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations- Massenspektroskopie (MALDI)	109
4.5.3.2	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS)	110
4.5.5	Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der <i>E.coli</i> NR- Aktivität	111
4.5.6	Benzviologen zur qualitativen Bestimmung der <i>E.coli</i> NR-Aktivität	111
4.5.7	PrecursorZ Aufreinigung	112
4.6	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
4.6.1	Pflanzenanzucht und DNA-Isolation	113
4.7	Arbeiten mit <i>Neurospora crassa</i>	113
4.7.1	Anzucht und Präparation der <i>Neurospora crassa nit</i> -Mutanten	113
4.7.2	Nachweis von MPT durch Komplementation der <i>nit-1</i> Mutante	114
4.7.3	Isolation von genomischer DNA aus <i>N. crassa</i>	114
4.7.4	Isolation von gesamt RNA aus <i>N. crassa</i>	115
5.	Literaturverzeichnis	116
6.	Anhang	125
6.1	Primer	125
6.2	Sequenzen	127

Abbildungen und Tabellenverzeichnis:

Abb. 1.1	Strukturformel des eukaryotischen Molybdäncofaktors	4
Abb. 1.2	Hypothetischer Reaktionsverlauf der Biosynthese von PrecursorZ (nach Wuebbens, 1995; Rieder <i>et al.</i> , 1998)	6
Abb. 1.3	Modell der reduktiven S-Adenosylmethionin-Spaltung durch SAM-Proteine	7
Abb. 1.4	Struktur von MoaC	8
Abb. 1.5	Struktur von MogA und MoeA	10

Abb. 1.6	Modell der Moco-Biosynthese	13
Abb. 2.1	Aktivierung und Assemblierung der MPT-Synthase in <i>E.coli</i>	16
Abb. 2.2	Spaltung und Aufreinigung der Intein-Fusionsproteine	18
Abb. 2.3	Massenspektroskopische Untersuchung der Intein-gespaltenen MoaD Varianten	19
Abb. 2.4	Assemblierung der <i>E.coli</i> MPT-Synthase aus ihren Untereinheiten.	22
Abb. 2.5	Aktivitätsbestimmungen der <i>E.coli</i> MPT-Synthase	24
Abb. 2.6	MPT-Synthase Struktur mit hervorgehobenen Seitenketten mutagenisierter Aminosäuren	26
Abb. 2.7	Nitratreduktase Overlay-Assay der <i>moaE</i> -Mutanten nach Expression verschiedener <i>moaE</i> -Mutanten	27
Abb. 2.8	Expression der MoaE-Mutanten	27
Abb. 2.9	Native Gelelektrophorese der MoaE Mutanten bzw. ihrer Komplexe mit MoaD	29
Abb. 2.10	ESI-Massenspektroskopie von gereinigtem PrecursorZ	31
Abb. 2.11	Overlay-Assay der <i>iscS</i> -Mutante (CL100 <i>iscS</i> ⁻) mit korrespondierenden Wildtyp MC1061	33
Abb. 2.12	MPT-Messungen der <i>iscS</i> -Mutante unter verschiedenen Anzuchtbedingungen	35
Abb. 2.13	Ausschnitt des Western-Blots der MPT-Synthase Expressionskinetik in der <i>iscS</i> Mutante	36
Abb. 2.14	Alignment IscS homologer Proteine	38
Abb. 2.15	Quantitative Bestimmung der Nitratreduktase Aktivität komplementierter Mutanten	42
Abb. 2.16	MPT-Messung komplementierter Mutanten	44
Abb. 2.17	Co-Reinigung pflanzlicher kleiner mit großer MPT-Synthase-Untereinheit nach heterologer Expression in <i>E.coli</i>	45
Abb. 2.18	SDS-Trycingel der aufgereinigten Cnx7-Proteine	46
Abb. 2.19	Ni-NTA Aufreinigung von Cnx6.	47
Abb. 2.20	Cnx6 Probe nach Ankonzentrierung	47
Abb. 2.21	Coomassie gefärbtes Trycingel der Gelfiltrations-Fractionen von Cnx6 und Cnx6 + MoaD	50
Abb. 2.22	MPT-Synthase Aktivität assemblierter pflanzlicher, bakterieller und chimärer MPT-Synthasen	51
Abb. 2.23	Trycingel der aufgereinigten MOCS2A-Proteine	52
Abb. 2.24	MOCS2B im 15%tigen SDS-Gel	53
Abb. 2.25	Rekonstitutionsversuche der <i>E.coli moaE</i> -Mutante KB2050 durch Expression großer humaner und pflanzlicher Untereinheiten	54
Abb. 2.26	<i>In vitro</i> MPT-Synthase Aktivität assemblierter humaner und bakterieller MPT-Synthase sowie chimärer Proteine	56
Abb. 2.27	Vergleichende Balkendiagramme der MPT-Synthase-Aktivitäten	57

Abb. 2.28	Cnx6-Sequenzvergleich zwischen Wildtyp und <i>chl5</i> -Mutante	59
Abb. 2.29	Cnx6-Mutation im Aminosäure-Alignment	60
Abb. 2.30	Phänotypen von <i>A. thaliana</i> (Ökotyp <i>L. erecta</i>) Wildtyp im Vergleich zur <i>chl5</i> Mutante	61
Abb. 2.31	Sequenz-Alignment kleiner Untereinheiten der MPT-Synthase	63
Abb. 2.32	Aminosäure-Sequenz-Alignment großer Untereinheiten der MPT-Synthase	64
Abb. 2.33	Sequenz-Alignment MoeB homologer Proteine	65
Abb. 2.34	PCR-Amplifikation der drei untersuchten Gene	66
Abb. 2.35	Klonierung der PCR-Amplifikate in pGEM-T Easy	66
Abb. 2.36	PCR der RT-Reaktion	68
Abb. 2.37	PCR des <i>moeB</i> -Homologons mit verschiedenen 5' Primern	69
Abb. 2.38	Sequenzvergleich des Elektropherogramms der kleinen Untereinheiten von <i>N.crassa</i> WT und <i>nit-8</i>	70
Abb. 2.39	Sequenz mit Leserasterverschiebung der kleinen Untereinheit in <i>nit-8</i>	70
Abb. 3.1	Struktur der bakteriellen MPT-Synthase	73
Abb. 3.2	Theoretische Reaktionswege der PrecursorZ Konversion	76
Abb. 3.3	Theoretischer Reaktionsmechanismus der MPT-Synthase bei Kooperativität der beiden aktiven Zentren	78
Abb. 3.4	Zentrale Rolle von IscS (nach Lauhon und Kambampati, 2000)	79
Abb. 3.5	Darstellung der hypothetischen MoaD-Aktivierung in Analogie zur Thiaminbiosynthese	80
Abb. 3.6	Modell der Schwefelübertragung in der Thiaminbiosynthese	81
Abb. 3.7	Modell der Reaktion von PrecursorZ zu MPT in <i>E.coli</i>	83
Abb. 3.8	Modell der Reaktion von PrecursorZ zu MPT in Pflanzen und Menschen	88
Abb. 3.9	Mutation des <i>chl5</i> Proteins (Cnx6) übertragen auf die homologe <i>E.coli</i> MoaE-Struktur	90
Abb. 3.10	Ausschnitt des Aminosäure-Sequenz-Alignments großer Untereinheiten im Bereich der Interaktion mit der jeweiligen kleinen Untereinheit	91
Abb. 3.11	C-terminales Alignment der Rhodanese Domänen mit <i>E.coli</i> GlpE	92
Abb. 3.12	Vergleich der hypothetischen Reaktionsmechanismen einer Rhodanese mit der Schwefelübertragung von CnxF auf CnxG	93
Abb. 3.13	Domänen-Vergleich der isolierten <i>N.crassa</i> Proteine des zweiten Schritts der Moco-biosynthese mit denen anderer Organismen	94
Abb. 3.14	Auswirkungen der identifizierten Mutationen in <i>nit-1</i> und <i>nit-8</i>	97
Abb. 4.1	Vereinfachtes MALDI Prinzip mit Reflektor-Flugrohr	110
Abb. 4.2	Vereinfachtes ESI Prinzip	111
Abb. 6.1	Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der kleinen Untereinheit.	127
Abb. 6.2	Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der großen Untereinheit.	129

Abb. 6.3	Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der Adenylase-Sulfurase.	133
Tab. 1.1	Mutanten von <i>N. crassa</i> (Tabelle verändert nach Heck, 1995).	15
Tab. 2.1	Massenspektroskopische Untersuchung der <i>in vitro</i> Synthese von MPT mit gereinigten MPT-Synthase Untereinheiten	25
Tab. 2.2	Charakterisierung der MoaE Mutanten	28
Tab. 2.3	MPT-Synthase-Aktivität verschiedener <i>E.coli</i> Extrakte im <i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay	34
Tab. 2.4	Übersicht der Komplementation im qualitativen Overlay-Assays	41
Tab. 2.5	Pflanzliche chloratresistente Mutanten (A) und Lokalisation der Moco-Gene (B)	58
Tab. 6.1	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer	125

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
<i>amp</i>	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AO	Aldehydoxidase
<i>arg</i>	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bidest	bidestilliertes Wasser
bla	Ampicillin-Resistenz-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	cirka
CBD	Chitin-Bindungs-Domäne
cDNA	komplementäre DNA ("complementary" DNA)
CDP	Cytidin-Diphosphat
<i>chl</i> bzw. Chl	Bezeichnung der Chlorat-Resistenz vermittelnden Gene bzw. Proteine in Pflanzen (nach Crawford, 1992)
<i>cnx</i> bzw. Cnx	internationale Bezeichnung für Gene bzw. Proteine der Molybdäncofaktorsynthese in Pflanzen und Pilzen („cofactor for nitrate reductase and xanthin dehydrogenase")
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Term.	Carboxyterminus
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	didesoxy-Nucleosidtriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxynuklease
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FeMoCo	Eisen-Molybdän-Cofaktor
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GDP	Guanosin-Diphosphat
GMP	Guanosin-Monophosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCl	Hydrochlorid
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IscS	Eisen-Schwefel-Cluster Synthase Protein S
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
m, mm, µm, nm	Meter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM, nM, pM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar, pikomolar
mol, mmol, µmol, nmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol, Pikomol
min	Minute
mind.	mindestens
MeOH	Methanol
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
<i>mocs</i> bzw. MOCS	Bezeichnung für Molybdäncofaktor-Synthese-Gene/Proteine in Säugetieren
MPT	Molybdopterin
mRNA	“messenger“-RNA
MW	Molekulargewicht
N	Stickstoff
NAD(P)H	Nikotinaquindenindinukleotid(phosphat) reduziert

NED	Naphthyl-Ethylendiamin
<i>nit</i>	Bezeichnung für <i>Neurospora crassa</i> -Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, auf Nitrat als alleiniger N-Quelle zu wachsen ("nitrate non utilizer")
NO_3^-	Nitrat
NR	Nitratreduktase
N-Term.	Aminoterminus
O	Sauerstoff
OAc	Acetat
OD	optische Dichte
ori	"origin of replication" (Replikationsursprung)
P	Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
persönl.	persönlich
<i>PWO</i> -Polymerase	<i>Pyrococcus woesei</i> -DNA-Polymerase
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rotations per minute")
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SA	Sulfanilamid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SO	Sulfitoxidase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
<i>TAQ</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	"unit"
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
Vol.	Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w	Gewichtsprozent ("weight")

Xdh	Xanthindehydrogenase
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Artnamen

<i>A. fulgidus</i>	<i>Archeoglobus fulgidus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. influenza</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>P. purpurea</i>	<i>Porphyra purpurea</i>
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<i>Synechococcus spec.</i>	<i>Synechococcus species</i>
<i>Synechocystis spec.</i>	<i>Synechocystis species</i>

Zusammenfassung

Die universelle Funktion des Molybdäncofaktors (Moco) zeigt sich in seiner hochkonservierten Struktur als essentieller Bestandteil aller bisher beschriebenen Molybdoenzyme, mit Ausnahme der Nitrogenase. Die Biosynthese des Cofaktors in Eukaryonten kann in drei Schritte unterteilt werden. Ausgehend von einem Guanosinderivat wird die schwefelfreie Pterinverbindung PrecursorZ hergestellt. Die Einführung einer Dithiolengruppe durch die MPT-Synthase schließt die Synthese der organischen Komponente des Cofaktors ab. Molybdopterin (MPT) wird im letzten Schritt durch die Komplexierung von Molybdat in aktiven Moco umgewandelt.

Die Aufklärung des molekularen Reaktionsmechanismus der Konversion von PrecursorZ zu MPT stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Gelfiltrationsexperimente deuteten darauf hin, daß die *E.coli* MPT-Synthase ein heterotetrameres Enzym ist, das aus je zwei kleinen und großen Untereinheiten besteht. Die Aufklärung der Struktur durch Rudolph *et al.* (2001) bestätigte dies eindeutig. Das Intein-Protein-Expressionssystem lieferte den Schlüssel zur funktionellen Charakterisierung der MPT-Synthase. Die postulierte *in vivo* Aktivierung durch Schwefelübertragung auf den C-Terminus der kleinen Untereinheit wurde *in vitro* ermöglicht. Damit konnte die kleine Untereinheit sowohl in nicht-modifizierter als auch in potentiell aktivierter Form als C-terminales Thiocarboxylat hinsichtlich ihrer Komplexbildungseigenschaften mit der großen Untereinheit und resultierender Aktivität untersucht werden. Die *in vitro* Assemblierung des MPT-Synthase Komplexes aus seinen einzeln exprimierten Untereinheiten erfolgte unabhängig vom Zustand der kleinen Untereinheit. Anschließende Aktivitätsmessungen belegten jedoch eindeutig, daß für eine Aktivierung der kleinen Untereinheit die C-terminale Thiocarboxylierung unabdingbar ist.

Aktive pflanzliche und humane MPT-Synthase konnte zwar ebenfalls mit Hilfe des Intein-Systems erzeugt werden, die Aktivitäten lagen jedoch im Vergleich zur bakteriellen nur etwa bei 5 bzw. 1,4%. Im humanen System ließ sich die geringe Aktivität auf die inaktive große Untereinheit zurückführen, während im pflanzlichen System die inaktive kleine Untereinheit verantwortlich war. Durch die Kombination der beiden aktiven Teile pflanzlicher und humaner MPT-Synthase konnte eine MPT-Synthase-Chimäre erzeugt werden, die im Vergleich zum homologen bakteriellen Komplex mit 31% deutliche Aktivität erzielen konnte. Demzufolge scheint eine generell geringere Aktivität der eukaryontischen Proteine auszuschließen sein.

Die Thiocarboxylierung der kleinen Untereinheit wird nach der Adenylierung durch MoeB von einem bisher nicht beschriebenen Protein katalysiert. Die Beteiligung der Cysteindesulfurase IscS wurde untersucht. Obwohl in aerob angezogenen *iscS* Mutanten keine endogene MPT-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, war nach Überexpression der MPT-Synthase Aktivität messbar, wenn auch im Vergleich zum

Wildtyp reduziert. Eine redundante Bedeutung von IscS für die Bereitstellung des thiocarboxyl-Schwefels der kleinen Untereinheit kann damit nicht ausgeschlossen werden.

1. Einleitung

1.1 Molybdän in biologischen Systemen

Die Relevanz des Spurenelements Molybdän (Mo) für das Wachstum von Pflanzen und Mikroorganismen war seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts bekannt (zusammengefaßt durch Coughlan, 1980), die Natur der biologisch aktiven Form des Molybdäns blieb jedoch lange Zeit unerforscht. Mo-Mangelerkrankungen bei Nutzpflanzen wurden vor über 50 Jahren beschrieben (zusammengefaßt durch Gupta, 1997) und konnten auf einen Verlust der Nitratreduktase (NR)-Aktivität zurückgeführt werden. Die NR katalysiert die Schlüsselreaktion der anorganischen Stickstoff-Assimilation und ist damit für Pflanzen essentiell.

In ihrem aktiven Zentrum enthalten eukaryontische und prokaryontische NRs das katalytische Metall Mo. Als weitere Mo-Enzyme in höheren Pflanzen konnten die im Purin-Katabolismus involvierte Xanthindehydrogenase (XDH) und Aldehydoxidasen (AO) identifiziert werden. Für letzere wurde eine Beteiligung an der Phytohormon-Biosynthese nachgewiesen, indem gezeigt werden konnte, daß sie jeweils den letzten Schritt der Synthese von Indolyllessigsäure (Koshiba *et al.*, 1996) und Abscisinsäure (Walker-Simmons *et al.*, 1989; Taylor, 1991; Seo *et al.*, 2000) katalysieren. Kürzlich wurde mit der Sulfitoxidase (SO) das vierte Mo-Enzym in Pflanzen entdeckt (Eilers *et al.*, 2001). Ihre Bedeutung ist in tierischen Organismen bekannt ist, in Pflanzen konnte ihr jedoch noch keine physiologische Rolle zugeschrieben werden.

Die Bedeutung von Mo für Menschen und Tiere wurde erstmals durch den Nachweis der Bindung von Mo an die Xanthinoxidase in Leber und Magen von Ratten gezeigt (Reichert & Westerfeld, 1953). Dies galt gleichzeitig als erster Hinweis auf die Assoziation von Mo mit einem Enzym. Wenig später wurde dann auch die Mo-Abhängigkeit der tierischen Aldehydoxidase (Mahler *et al.*, 1954) gezeigt, was im selben Jahr auch für die Nitratreduktase des Ascomyceten *Neurospora crassa* (Nicholas *et al.*, 1954; Nicholas & Nason, 1954) gelang, bevor schließlich durch Cohen *et al.* (1971) auch die humane Sulfitoxidase als Molybdoenzym klassifiziert wurde. Bis heute wurde eine Vielzahl weiterer Enzyme, die das Metall Mo in gebundener Form für die Katalyse verschiedenster Oxidations- und Reduktionsreaktionen benötigen, in allen Organismenreichen gefunden. Der Großteil dieser mehr als 40 Enzyme, die in verschiedene Familien unterteilt werden (Hille,

1996a; Hille, 1996b; Kisker *et al.*, 1997), ist dabei prokaryontischen Ursprungs, eine vergleichsweise geringe Anzahl ist unter den Eukaryonten zu finden.

1.2 Der Molybdäncofaktor

Mit der genetischen Analyse des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* wurde der Grundstein zur Untersuchung des Mo-Metabolismus gelegt. Cove und Pateman (1963) isolierten sechs NR-Mutanten, von denen fünf neben dem Verlust der NR-Aktivität auch einen simultanen Verlust der ebenfalls Mo-abhängigen XDH-Aktivität zeigten. Da Mo die einzige Gemeinsamkeit dieser ansonsten so unterschiedliche Reaktionen katalysierenden Enzyme zu sein schien, wurde von Pateman *et al.* (1964) auf einen gemeinsamen Molybdän-Cofaktor (Moco) geschlossen, dessen Synthese in den entsprechenden NR⁻/XDH⁻-Mutanten defizient war. Die an der Synthese dieses Cofaktors beteiligten Genloci wurden daraus resultierend mit der Bezeichnung "cnx" für "cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase" versehen. Diese Namensgebung wurde später auch für Pflanzen beibehalten, wohingegen für die entsprechenden bakteriellen Loci die Operon-Bezeichnungen "moa, mob, mod, moe und mog" sowie für Säuger die Bezeichnung "mocs" (molybdenum cofactor synthesis) eingeführt wurden. Daß der Moco nicht nur innerhalb der Molybdoenzyme eines Organismus, sondern auch innerhalb der Molybdoenzyme verschiedener Organismen austauschbar ist, konnte von Nason *et al.* (1971) gezeigt werden. Sie komplementierten inaktives NR-Apoenzym der *Neurospora crassa nit-1* Mutante durch Zugabe Moco-haltiger Enzyme tierischen, pflanzlichen sowie bakteriellen Ursprungs zu funktionell aktiver NR. Hierdurch war ein bedeutender Hinweis auf die universelle Struktur, die ubiquitäre Verbreitung und die konservierte Funktion des Mocos gegeben. Lediglich die Nitrogenase war als einziges unter den Mo-haltigen Enzymen nicht zur Komplementation der *nit1*-Mutante in der Lage, woraufhin auf eine andersartige Struktur der Mo-haltigen Komponente des Enzyms geschlossen wurde (Pienkos *et al.*, 1977). Wie kurz darauf gezeigt werden konnte, wird das Mo der Nitrogenase in bisher einzigartiger Weise über Homocitrat als Fe-Moco komplexiert und ist nicht mit dem Moco anderer Mo-Enzyme vergleichbar (Shah & Brill, 1977).

1.2.1 Die Struktur des Molybdäncofaktors

Entsprechend der ausgesprochen labilen Natur des Moco und seiner extremen Sensitivität gegenüber Sauerstoff wurde ein Großteil der Strukturanalyse des Moco an dessen Degradations- und Oxidationsprodukten durchgeführt. Zunächst konnte so durch Charakterisierung des Moco aus Xanthinoxidase (XO), SO und NR ein Pterin als strukturelle organische Komponente des Moco identifiziert werden (Johnson *et al.*, 1980). Mit Hilfe der Moco-Oxidationsprodukte FormA und FormB wurde wenig später auch die Präsenz einer vier C-Atome umfassenden Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester am C6-Atom der Pterin-Komponente festgestellt (Johnson *et al.*, 1984). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen FormB und dem natürlichen Metaboliten Urothion ließen Johnson *et al.* (1982) ferner auch auf die Gegenwart von Schwefel-Gruppen im Moco schließen, was durch die Bindung von Moco an Thiolsepharose (Mendel 1983), die Sensitivität des Moco gegenüber Sulfhydrylreagenzien sowie durch seine Stabilisierung in Gegenwart von reduzierenden Agenzien untermauert wurde (Alikulov & Mendel, 1984). Tatsächlich zeigte die strukturelle Charakterisierung des Cofaktors nach Behandlung mit thiol spezifisch alkylierendem Iodoacetamid die Präsenz zweier Thiole am C1- und C2-Atom der Seitenkette auf, die zusammen eine Dithiolengruppe ausbilden (Kramer *et al.*, 1987). Ein auf der Basis all dieser Daten erstelltes Modell der Struktur des aktiven Moco schlug die Assemblierung des Mo-Atoms an eine bityclische 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Komponente über die Dithiolengruppe sowie die Bindung zweier weiterer Liganden an das Mo-Atom vor (Kramer *et al.*, 1987). Seither wird die Mo-enthaltende, aktive Form des Molybdän-Cofaktors als Moco, die Mo-freie, inaktive Form hingegen als Molybdopterin (MPT) bezeichnet. Jedoch konnte erst 1995 mit der ersten Kristallisierung eines Molybdoenzyms, der Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*, durch Romao *et al.* die Richtigkeit dieses Moco-Struktur-Modells überprüft werden. Die Struktur offenbarte als einzige Abweichung zum vorgeschlagenen Modell die tricyclische Struktur durch die Ausbildung eines Pyranringes zwischen dem C3-Atom der Seitenkette und dem C7-Atom des Pterins (Abb. 1.1). Das Vorliegen des nativen Moco als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin wurde später durch die Aufklärung der Strukturen weiterer bakterieller Molybdoenzyme bestätigt (Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). Basierend auf den Erkenntnissen, daß die *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* sowohl durch

prokaryontischen als auch durch eukaryontischen Moco komplementiert werden kann, wurde diese Struktur als unter allen Organismen konserviert vorgeschlagen. Wie jedoch gezeigt werden konnte, assoziiert der Moco eubakterieller Molybdoenzyme ein Nukleotid über eine Pyrophosphatbindung an das C4-Atom der Seitenkette des MPTs (Johnson *et al.*, 1990) und weicht insofern von der Struktur des eukaryontischen Mocos ab. Da diese Variationen jedoch nicht die Grundstruktur des Mocos in Frage stellen, kann weiterhin von einer unter allen Organismen konservierten Struktur des Mocos ausgegangen werden.

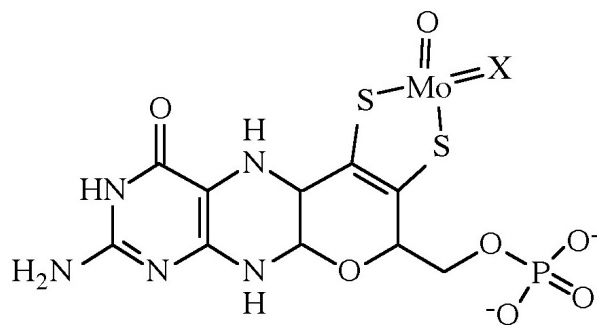


Abb. 1.1 Strukturformel des eukaryotischen Molybdäncofaktors

Die dargestellte Form zeigt den eukaryontischen Molybdäncofaktor. Das X am Molybdän steht entweder für ein O (Dioxo-Form) oder ein S (Monooxo-Form).

1.3 Die Biosynthese des Molybdäncofaktors

Die Untersuchung der Biosynthese des Molybdäncofaktors begann mit der Charakterisierung pleiotroper Mo-Enzym Mutanten von *E.coli*. Ursprünglich wurden diese Mutanten mit *chl* bezeichnet, da sie über Chloratresistenz selektiert wurden. Zur Abgrenzung von den nicht pleiotropen Mutanten wurde die Bezeichnung *mo* für Cofaktor-Mutanten von *E.coli* eingeführt, ein dritter Buchstabe kennzeichnet das Operon (Shanmugan *et al.*, 1992). Die Strukturen der wichtigsten Operon-Systeme wurden geklärt und die beteiligten Gene kloniert und sequenziert. Rajagopalan *et al.* (1992) zeigten zusammenfassend, daß mehr als 15 Gene auf fünf *mo*-Operonen an der Synthese des Mocos in *E.coli* beteiligt sind. Die Biosynthese läßt sich dabei in drei Abschnitte unterteilen. Zuerst wird aus einem Guanosinderivat der schwefelfreie PrecursorZ generiert, dieser wird im zweiten Schritt zur fertigen organischen

Komponente Molybdopterin umgesetzt und abschließend erfolgt die Komplexierung von Molybdän zum fertigen Moco.

1.3.1 Biosynthese von PrecursorZ

Im Vergleich des ersten Schritts der Moco-Biosynthese mit der Biosynthese anderer Pterine wie Biopterin, Folaten (Brown, 1985) oder der Flavine (Bacher, 1990) ist jeweils GTP das postulierte Edukt des Syntheseweges. Im Unterschied zur Moco-Biosynthese wird die Synthese der anderen Pterine durch Ring-Erweiterung am GTP unter Katalyse der Cyclohydrolasen I oder II initiiert. Die Analyse von GTP-Cyclohydrolase defizienten humanen Zelllinien zeigte volle Aktivität des Molybdoenzyms Sulfidoxidase, wodurch eine Überlagerung der frühen Biosyntheseschritte anderer Pterine mit der der Moco-Biosynthese ausgeschlossen werden konnte (Johnson & Rajagopalan 1989).

Alle Kohlenstoffatome radioaktiv markierten GTPs fanden sich nach *in vivo* Synthese in aufgereinigtem PrecursorZ wieder, dabei konnte das C8-Atom des GTPs an der C2'-Position des PrecursorZ lokalisiert werden (Wuebbens *et al.*, 1995). Postuliert wurde eine alternative, Cyclohydrolase-ähnliche Reaktion mit Umlagerung der Kohlenstoffseitenkette (Wuebbens *et al.*, 1995). Dabei wird der Imidazolring des Guanins hydrolysiert, linearisiert und es kommt zu einer Umlagerung der Ribose. Auf das C2'-Kohlenstoffatom des entstehenden Intermediats wird eine aus dem C8 Kohlenstoff des Guanins hervorgegangene Formyl-Gruppe übertragen. Sie wird zwischen die C2' und C3' Position der Seitenkette inseriert. Nach Wassereliminierung wird der Pterin-Ring geschlossen und es entsteht ein phosphoryliertes Dihydropterin mit einer vier Kohlenstoff Atome umfassenden sechs-Alkyl-Seitenkette. Diese wird cyclisiert, wobei es zum Verlust zweier Phosphate der Seitenkette kommen muß, falls GTP das Edukt der Reaktion ist. PrecursorZ entsteht als erstes fassbares Zwischenprodukt der Moco-Biosynthese (Abb.1.2). Andere Guanosinderivate wie GMP können als Reaktionsedukte trotz der Fütterungsversuche mit GTP nicht ausgeschlossen werden, da *E.coli* keine phosphorylierten Verbindungen transportieren kann und die drei Phosphate zum Eintransport in die Zelle entfernt werden müssen. Eine Rephosphorylierung zu GTP ist dabei jedoch nicht auszuschließen.

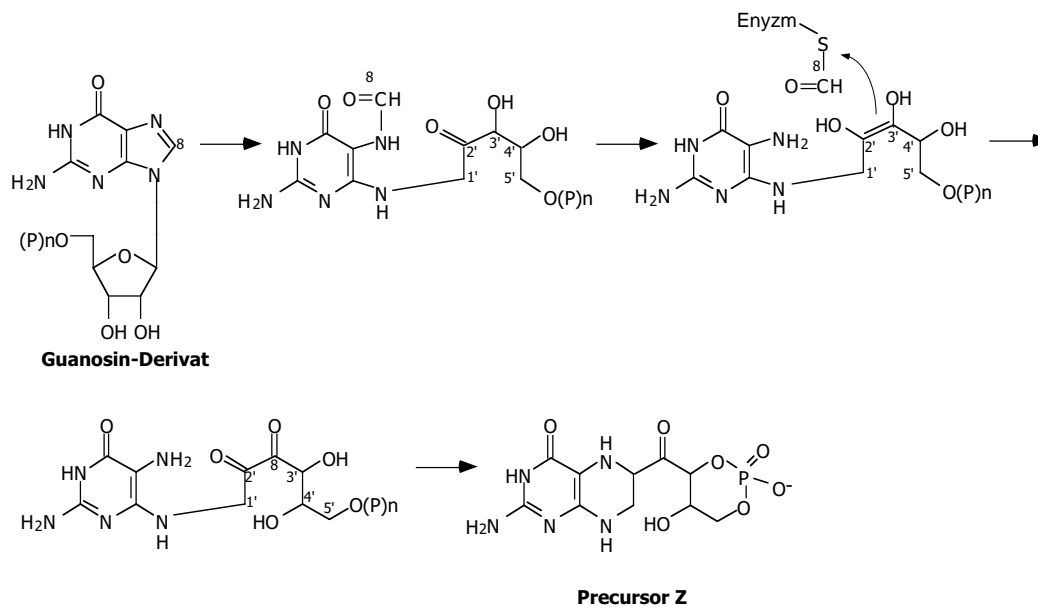


Abb. 1.2 Hypothetischer Reaktionsverlauf der Biosynthese von PrecursorZ (nach Wuebbens, 1995; Rieder *et al.*, 1998)

Rieder postulierte die enzymgebundene Form der Formylgruppe. (P)n steht für Phosphatgruppen am Guanosinderivat.

Katalysiert wird die Synthese von PrecursorZ in *E.coli* durch die beiden Proteine MoaA und MoaC, in *A.thaliana* und dem Menschen konnten jeweils homologe Proteine identifiziert werden (Cnx2 und Cnx3 bzw. MOCS1A und MOCS1B) (T.Hoff *et al.*, 1995; J.Reiss *et al.*, 1998).

MoaA und seine homologen Proteine zeichnen sich durch zwei Cystein-Cluster aus, die vermutlich an einer Eisen-Schwefel-Cluster Bindung beteiligt sind. Sie gehören zu der neuen Proteinfamilie der „Radikal- S-Adenosylmethionin (SAM) Proteine“ (Sofia *et al.*, 2001). Durch reduktive Spaltung von SAM über ein Eisen-Schwefelcluster können radikalische Verbindungen entstehen (Abb. 1.3). Welche Rolle diese bei der Synthese von PrecursorZ spielen ist ungeklärt. Zu der SAM-Familie gehören Proteine, die diverse Reaktionen wie Isomerisierungen, ungewöhnliche Methylierungen, Schwefel-Insertionen, anaerobe Oxidationen oder Protein-Radikal Bildungen katalysieren (Sofia *et al.*, 2001).

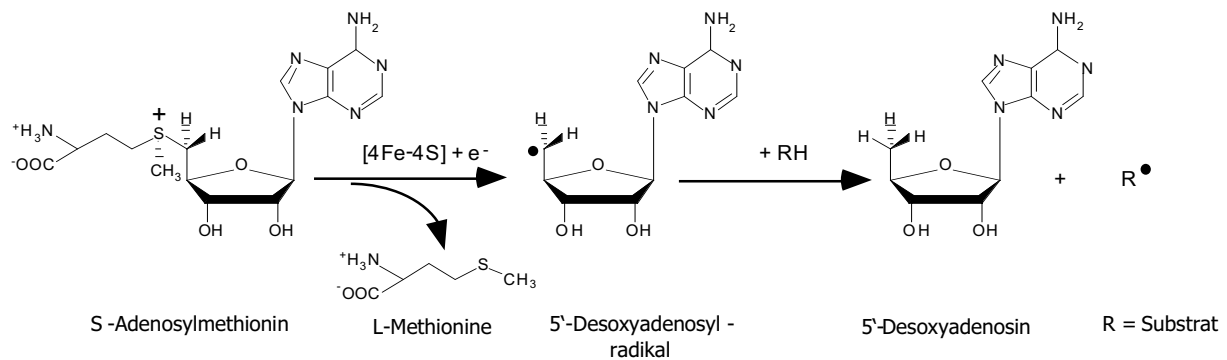


Abb. 1.3 Modell der reduktiven S-Adenosylmethionin-Spaltung durch SAM-Proteine

Durch das vier-Eisen-vier-Schwefel-Cluster (4FE-4S) der SAM-Proteine wird S-Adenosylmethionin gespalten, wobei L-Methionin und ein 5'-Desoxyadenosylradikal entstehen. Durch Reaktion mit einem Substrat entstehen 5'-Desoxyadenosyl und ein Substratradikal (R^\bullet)

Darüber hinaus zeichnen sich MoaA und seine homologen eubakteriellen und eukaryotischen Proteine durch ein C-terminales Doppelglycin-Motiv aus, das in ähnlicher Form auch im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese als Charakteristikum der kleinen Untereinheit der MPT-Synthase gefunden wurde. Das humane *mocs1A* soll bicistronisch zusammen mit *mocs1B* durch Ribosomen-Reinitiation exprimiert werden (Reiss *et al.*, 1998). Durch RNA-Untersuchungen wurden alternative Spliceformen identifiziert, bei denen Fusionsproteine beider offenen Leserahmen entstehen, in denen das terminale Doppelglycin von MOCS1A verloren geht (Gray & Nicholls, 2000). Die Expression der einzelnen humanen MOCS-Proteine in korrespondierenden *E.coli* Mutanten führte zur Komplementation der Mutanten (Hänzelmann, *et al.*, 2002), wodurch funktionelle Untersuchungen der postulierten Fusionsproteine möglich waren. Durch gezielte PCR-Mutagenese des C-Terminus von MOCS1A und die Expression der postulierten Fusionsproteine konnte gezeigt werden, daß das Doppelglycin-Motiv für die katalytische Aktivität von MOCS1A essentiell ist. Die postulierten Fusionsproteine waren lediglich in der Lage, *mocs1B*-Mutanten zu komplementieren. MOCS1A-Varianten mit verändertem C-Terminus waren nur dann noch fähig, *moaA* Mutanten zu komplementieren, wenn eines der beiden Glycine gegen eine andere kleine Aminosäure ausgetauscht wurde (AG*, GA*), die Deletion

des Motivs oder der Austausch eines Glycins gegen eine Aminosäure mit größerer Seitenkette führten zum Funktionsverlust (Hänzelmann, *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu MOCS1A konnte MOCS1B nur als Fusionsprotein mit inaktiven MOCS1A und nicht als freies Protein gezeigt werden (Hänzelmann, *et al.*, 2002), die postulierte Expression beider freien Proteine durch Ribosomen-Reinitiation scheint damit fraglich.

MoaC und seine homologen Proteine (u.a. Cnx3 und MOCS1B) konnten bisher funktionell nicht charakterisiert oder einer Proteinfamilie zugeordnet werden. Die Struktur von MoaC wurde jedoch gelöst, es handelt sich um ein Hexamer, das aus je drei MoaC-Homodimeren besteht (Abb.1.4), wobei aktive Zentren an den Berührungspunkten beider Monomere postuliert wurden (Wuebbens *et al.*, 2001). Ob die beiden Proteine MoaA und MoaC unabhängig arbeiten oder miteinander interagieren, ist bisher ebenfalls ungeklärt.



Abb. 1.4 Struktur von MoaC

Gezeigt ist ein Hexamer, bestehend aus drei MoaC-Homodimeren, jedes Monomer ist in einer anderen Farbe dargestellt

1.3.2 Konversion von PrecursorZ zu MPT

Im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese wird die organische Komponente des Kofaktors, das Molybdopterin synthetisiert. Dazu wird Schwefel über eine Dithiolengruppe in den PrecursorZ eingebaut. Diese Reaktion wird von der MPT-Synthase, bestehend aus großer und kleiner Untereinheit, katalysiert. Basierend auf Homologien zu den *E.coli* Genen (Pitterle und Rajagopalan, 1993), konnten

korrespondierende humane und pflanzliche Vertreter identifiziert werden. Im humanen System codiert *mocs2* bicistronisch mit überlappendem Leserahmen für die kleine Untereinheit MOCS2A und die große Untereinheit MOCS2B (Stallmeyer *et al.*, 1999). In *A.thaliana* konnte nur die große Untereinheit Cnx6 über Homologiesuchen identifiziert werden, erst durch die Interaktion mit Cnx6 im Two-Hybrid System wurde die kleine Untereinheit Cnx7 aus einer Genbank isoliert und identifiziert (Nieder, 1999).

Die MPT-Synthase muß zu ihrer Aktivierung sulfuriert werden. Durch Ähnlichkeiten der kleinen Untereinheit zu Ubiquitin wurde eine Übertragung des Schwefels auf ihr C-terminale Doppelglycinmotiv. Daran beteiligt ist in *E.coli* mit MoeB ein Protein, das ursprünglich als Sulphurylase beschrieben wurde. Zwischen der kleinen Untereinheit aus *moaA*- (in dieser Hinsicht dem Wildtyp entsprechend) und *moeB*-Mutanten konnte ein Größenunterschied der kleinen Untereinheit gezeigt werden. Dieser Unterschied von 16 Da wurde als ein MoeB-abhängiger Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom des Proteins interpretiert.

Die identifizierten eukaryontischen MoeB Vertreter besitzen N- und C-terminale Extensionen, wobei die C-Termini signifikante Homologien zu Rhodanesen aufweisen. Diese gehören zu den Sulfurtransferasen, einer Gruppe von Enzymen, die in Pflanzen, Tieren und Bakterien weit verbreitet ist. Sie katalysieren den Transfer eines Schwefel-Atoms von einem Sulfan-Schwefel enthaltenden Donormolekül auf ein thiophiles Akzeptormolekül. Die Rhodanese, die am besten charakterisierte Sulfurtransferase, wird über ihre *in vitro* Aktivität als Thiosulfat-Cyanid-Sulfurtransferase definiert. Diese Schwefel-übertragenden Proteine könnten dem MoeB Protein nach Genfusion eine zusätzliche Funktion verleihen, die in *E.coli* eventuell durch ein bisher nicht beschriebenes Protein übernommen wird.

Der zweite Schritt soll in dieser Arbeit untersucht, der Reaktionsmechanismus der PrecursorZ-Konversion aufgeklärt und eukaryontische Mutanten identifiziert werden. Die im Modell der Abb. 1.6 gezeigten Vorstellungen entsprechen nicht dem Kenntnisstand bei Fertigstellung dieser Arbeit, im Ergebnis- und Diskussionsteil wird die Umsetzung zu Molybdopterin eingehend beschrieben und aktualisierte Modelle werden diskutiert.

1.3.3 Incorporation von Molybdän in Molybdopterin

Der Biosynthese der organischen Komponente Molybdopterin schließt sich die Inkorporation von Molybdän an. In *E.coli* sind die beiden Proteine MogA und MoeA beteiligt, deren Strukturen aufgeklärt werden konnten. MogA bildet ein Homotrimer, bei dem jedes MogA-Monomer aus einem Kern von β -Faltblättern besteht der von α -Helices umgeben ist (Liu *et al.*, 2000; Abb. 1.5A). MoeA besteht aus vier Domänen, von denen eine strukturelle Verwandtschaft zu MogA aufweist. In seiner aktiven Form handelt es sich bei MoeA um ein Dimer (Xiang *et al.*, 2000; Abb. 1.5).

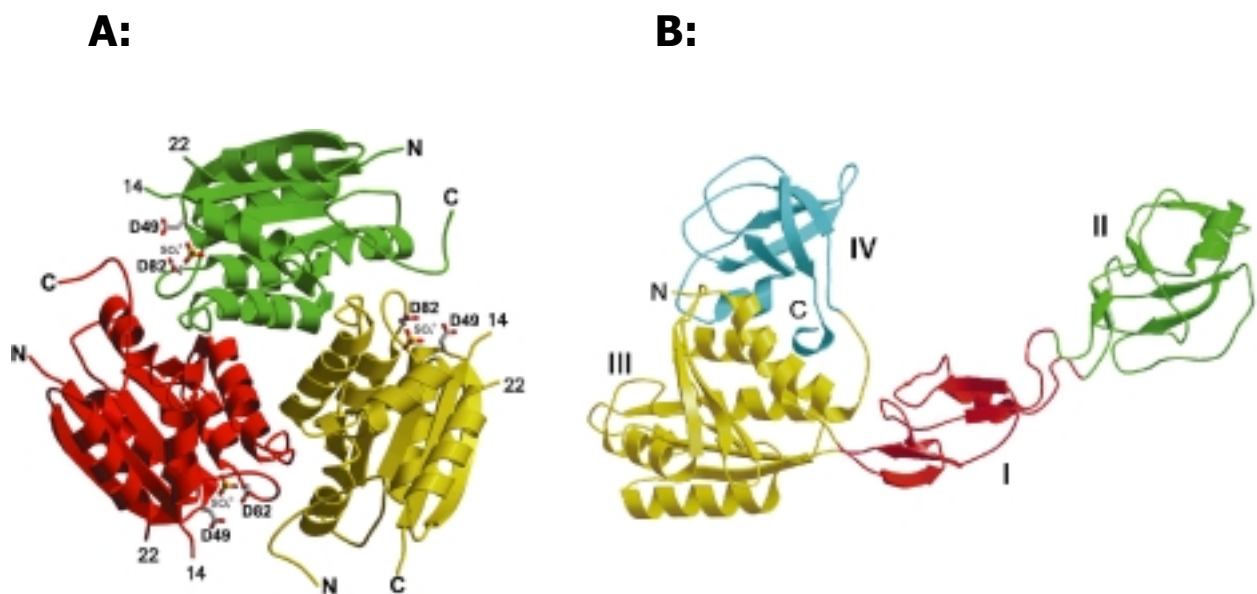


Abb. 1.5 Struktur von MogA und MoeA

A: zeigt ein Trimer aus drei MogA Molekülen, B: zeigt ein MoeA-Monomer (I-IV kennzeichnet die vier Domänen). Mit N und C sind jeweils die Aminotermini (N) und Carboxytermini (C) der Proteine hervorgehoben.

In Eukaryonten sind beide Proteine zu einer Polypeptidkette fusioniert. In Pflanzen konnte mit Cnx1 ein Protein isoliert werden, dessen N-Terminale Domäne Homologien zu MoeA aufweist (E-Domäne) und dessen C-Terminus zu MogA homolog ist (G-Domäne) (Stallmeyer *et al.*, 1995). In Tieren wurde beim Neuroprotein Gephyrin eine umgekehrte Domänenanordnung gefunden (Prior *et al.*, 1992). Da Gephyrin ursprünglich als ein Glycinrezeptoren verankerndes Protein beschrieben wurde (Prior *et al.*, 1992), kann ihm mit der Moco-Biosynthese eine

zweite Funktion zugeordnet werden (Stallmeyer *et al.*, 1999). Eventuell unterscheiden sich verschiedene Splicevarianten hinsichtlich ihrer Funktionalität.

E.coli mogA-Mutanten lassen sich durch die heterologe Expression der beschriebenen Gesamtproteine Cnx1 und Gephyrin bzw. ihrer G-Domänen funktionell komplementieren (Stallmeyer *et al.*, 1995; Stallmeyer *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2000). Bei *E.coli moeA*-Mutanten hingegen ist durch die Expression der Gesamtproteine bzw. ihrer E-Domänen keine Rekonstitution der Nitratreduktase möglich (Schwarz *et al.*, 2000).

MogA bzw. seine korrespondierenden eukaryontischen G-Domänen sollen die Insertion einer bisher nicht charakterisierten Form von Molybdän in das MPT katalysieren. Mit unphysiologisch hohen Molybdatkonzentrationen im Medium können *mogA*-Mutanten komplementiert werden. Durch Mutantanalyse der Cnx1-G-Domäne konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die für die MPT-Bindung (Schwarz *et al.*, 1997) und Moco-Stabilisierung verantwortlich sind (Kuper *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden Mutanten generiert, die keinen Phänotyp hinsichtlich der Substratbindung oder Produktstabilisierung zeigten, sondern einen katalytischen Defekt der Konversion von MPT zu Moco aufwiesen (Kuper *et al.*, 2000).

Die funktionelle Charakterisierung von *moeA* Mutanten zeigte keinen molybdatreparierbaren Phänotyp für Molybdoenzyme mit MGD-Cofaktor. Eine *Rhodobakter capsulatus moeA* Mutante war dagegen für Molybdoenzyme mit MPT-Cofaktor durch hohe Molybdatkonzentrationen zu komplementieren (Leimkühler *et al.*, 1999). Demzufolge scheint auch MoeA am Molybdäntransport, der Molybdän Aktivierung, oder dem Zusammenbau von MPT und Molybdän beteiligt zu sein. Die Subdomäne III von MoeA besitzt über die strukturelle Homologie zu MogA hinaus ein vergleichbares MPT-Bindungsmotiv. Weiter konnte gezeigt werden, daß der *moeA*-Mutantenphänotyp partiell durch Induktion der Schwefelassimilations-Genprodukte aufgehoben werden kann (Hanson & Shanmugam, 1997; Wachstum auf S-Mangelmedium). Mutationen in der ATP-Sulfonylase und der Sulfitreduktase heben diese Suppression wieder auf, wodurch geschlossen wurde, daß Molybdat unter Sulfat-Mangelbedingungen durch die Enzyme der S-Assimilation aktiviert und prozessiert werden könnte.

Basierend auf der dimeren Struktur von MoeA und der trimeren MogA Anordnung, kann für Gephyrin und Cnx1 ein hexagonales Cluster postuliert werden (Xiang *et al.*,

2000), was zur Ausbildung eines zweidimensionalen Netzwerkes führen könnte. Die Clusterbildung von Gephyrin zur geordneten Anordnung von Neurorezeptoren wurde postuliert, für Cnx1 ist eine Clusterbildung bisher hypothetisch. Hier könnte eine Verbindung zu hypothetischen Molybdattransportern sinnvoll erscheinen, eine Aktinbindung und Lokalisierung unterhalb der Membran konnte für Cnx1 gezeigt werden (Schwarz *et al.*, 2000).

An der Bereitstellung des Molybdäns in Form von Molybdat sind in Bakterien die Gene des *mod*-Operons beteiligt (*modA*, *modB* und *modC*), die für einen hochaffinen Molybdat-Transporter des ABC-Typs kodieren (Rech *et al.*, 1995). Homologe eukaryontische Vertreter konnten bisher nicht identifiziert werden.

Der vierte Schritt, das Anhängen eines Guanin-Nukleotids an das MPT, ist bisher nur für Eubakterien gezeigt. Dieser Schritt wird von den *mobAB* Genen kodiert und mündet in der aktiven Form des eubakteriellen Molybdäncofaktors als Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) (Palmer *et al.*, 1994, 1996).

Ein aktualisiertes Modell der Moco-Biosynthese, basierend auf den Vorschlägen für Bakterien und Pflanzen von Rajagopalan (1992) und Mendel (1997), ist in Abb. 1.6 gezeigt.

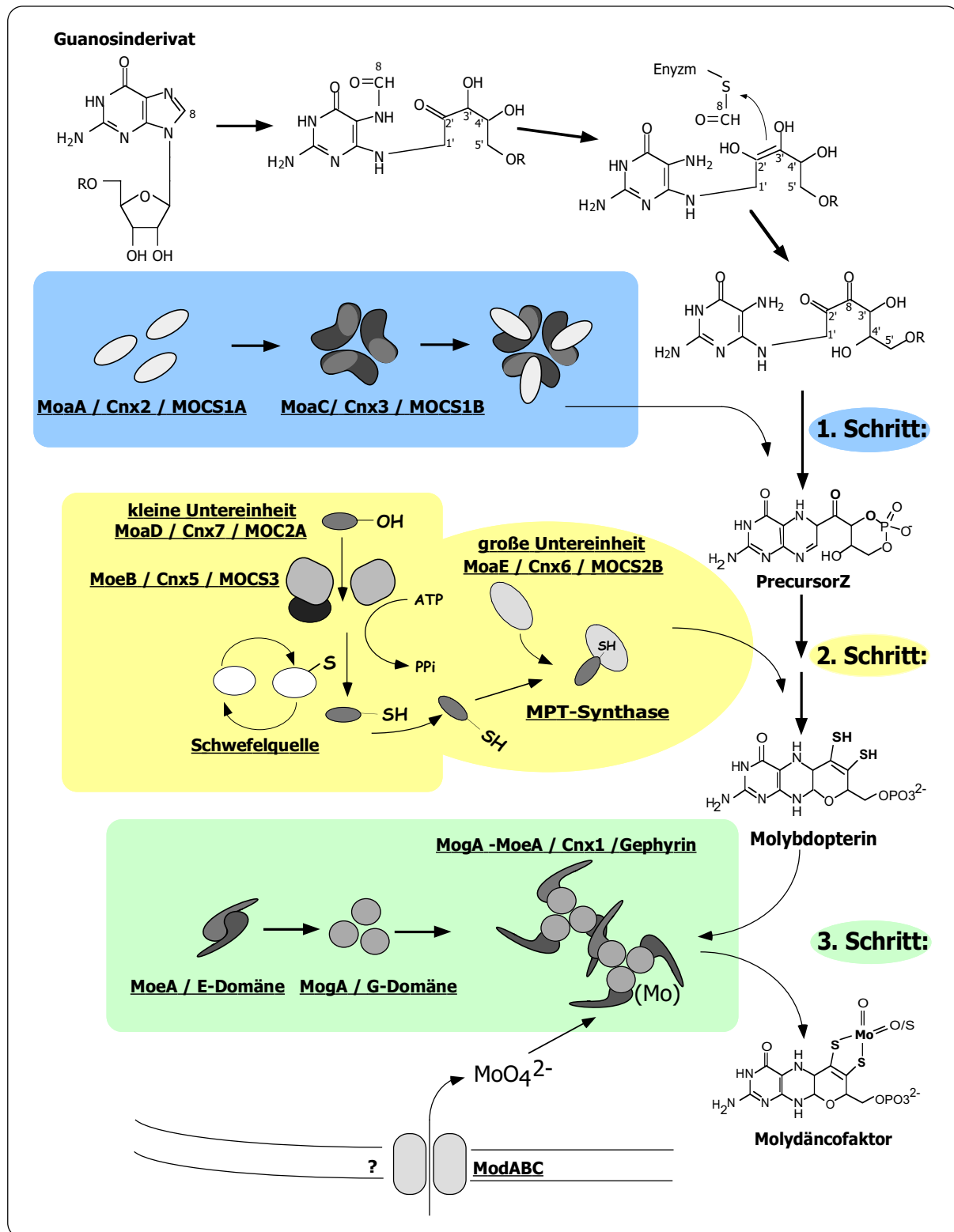


Abb. 1.6 Modell der Moco-Biosynthese

Die Moco-Biosynthese lässt sich in drei Schritte unterteilen: (1) PresursorZ-Synthese aus GTP, (2) Konversion von PrecursorZ zu GTP und (3) Molybdän-Insertion. Zu jedem beteiligten Protein ist die Nomenklatur des bakteriellen (Mo), pflanzlichen (Cnx) und humanen (MOCS bzw. Gephyrin) Systems angegeben.

1.4 Moco-Biosynthese in *Neurospora crassa*

Zur Untersuchung der Moco-Biosynthese in Pilzen wurden *N.crassa*- Nitratreduktase-Mutanten von Tomsett und Garret (1980) generiert. Zur Selektion der Nitratreduktase-defizienten Mutanten wurde chlorathaltiges Medium verwendet. Die Nitratreduktase akzeptiert neben Nitrat auch Chlorat als weiteres Substrat und reduziert es zu toxischem Chlorit (Aberg, 1974). Insgesamt wurden 25 pleiotrope Mutanten aus sechs Komplementationsgruppen identifiziert. Die Mutanten wurden mit *nit* bezeichnet, da sie nicht mehr in der Lage sind, auf Nitrat als alleiniger N-Quelle zu wachsen ("nitrate non utilizer"). Neben der schon vorher bekannten Mutante *nit-1* wurden fünf neue Cofaktormutanten (*nit-7*, *nit-8*, *nit-9A*, *nit-9B*, *nit-9C*) isoliert. Heck (1995) charakterisierte diese neuen *N.crassa*-Mutanten biochemisch. Insgesamt existieren elf verschiedene *nit*-Mutanten von *N.crassa* (siehe Tab. 1.1). Nur die Mutanten *nit-1*, *nit-7* und *nit-8* enthalten freies, funktionelles Apoenzym der Nitratreduktase, welches durch exogenen Molybdäncofaktor rekonstituiert werden konnte. Zwei dieser Mutanten, *nit-1* und *nit-8*, akkumulieren PrecursorZ, die Vorstufe des Molybdopterin (MPT). Die Mutationen liegen also auf Genen, die für Proteine des zweiten Schritts der Molybdäncofaktor-Biosynthese kodieren. In beiden Mutanten ist keine Aktivität der MPT-Synthase nachweisbar. Ein biochemischer Unterschied zwischen den beiden Mutanten wurde nicht gefunden. Nach Mischung zellfreier Extrakte beider Mutanten wurde keine Komplementation der MPT-Synthase nachgewiesen (Heck, 1995), obwohl dies erwartet werden konnte, da Tomsett und Garret 1980 bei der Klassifizierung der Mutanten bei gemeinsamer Kultur von *nit-1* und *nit-8* normales Wachstum auf festem Nitratmedium fanden. In der Mutante *nit-7* konnte kein PrecursorZ nachgewiesen werden, aktive MPT-Synthase konnte dagegen aufgereinigt werden. Diese Mutante ist die einzige Mutante des ersten Biosynthese-Schritts der Kofaktor-Synthese in *N. crassa*. Die Mutanten *nit-2*, *nit-3*, *nit-4* und *nit-5* sind Apoenzym-defiziente Mutanten. In den Mutanten *nit-9A*, B und C, die bei normaler Mo-Konzentration kultiviert wurden, konnte mit exogenem Molybdäncofaktor kein funktionelles Nitratreduktase-Apoprotein nachgewiesen werden. In Anwesenheit von unphysiologisch hohen Molybdätkonzentrationen bildeten sie aktive Nitratreduktase. Diese Mutanten akkumulierten ebenfalls PrecursorZ. Es wurde vermutet, daß die MPT-Synthase durch ihr Produkt

Molybdopterin gehemmt wird, denn aktives MPT konnte nachgewiesen werden. Dunn-Coleman (1984) vermutete das Vorliegen einer inaktiven Form des Cofaktors, die an die Nitratreduktase gebunden ist. Diese liegt dann in Form von Demolybdo-Nitratreduktase vor. Die Mutationen in *nit-9A*, B und C betreffen demnach den dritten Schritt der Biosynthese, den Zusammenbau von Molybdopterin und Molybdän zum Molybdän-Cofaktor (Heck, 1995).

Nach Mischung der zellfreien Extrakte der Nitratreduktase-defizienten Mutanten *nit-1* und *nit-3* von *N. crassa* bildete sich aktive Nitratreduktase (Nason *et al.*, 1970). *Nit-3* enthält den aktiven Cofaktor. Die Mutation liegt auf dem Apoenzymlocus. Die Cofaktor-Mutante *nit-1* bildet das freie Apoenzym. Aus dieser *in vitro*-Bildung von aktiver Nitratreduktase entwickelte sich ein routinemäßiger Test, der zum Nachweis des Molybdäncofaktors bis heute eingesetzt wird.

Die Mutationen der im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese betroffenen Stämme *nit-1* und *nit-8* sollen in dieser Arbeit durch Isolation und Sequenzierung der Gene der MPT-Synthase und des aktivierenden MoeB homologen aus Wildtyp und Mutanten charakterisiert werden.

Tab. 1.1 **Mutanten von *N. crassa*** (Tabelle verändert nach Heck, 1995).

Locus	Allel	FGSC Nr.	Kopplungsgruppe	Ort der Mutation
<i>nit-1</i>	34547	54	IR	Moco-Biosynthese 2. Schritt
<i>nit-2</i>	I7	2698	IL	Regulation der Nitratreduktase
<i>nit-3</i>	14789	3009	IVR	Nitratreduktase-Strukturgen
<i>nit-4</i>	keine #	2993	IVR	Induktion der Nitratreduktase
<i>nit-5</i>^{*1}	nr 15	985	IVR	Induktion der Nitratreduktase
<i>nit-6</i>				Strukturgen der Nitritreduktase
<i>nit-7</i>	V1M59	3933	IIIR	Moco-Biosynthese 1. Schritt
<i>nit-8</i>	V1M44	4236	IR	Moco-Biosynthese 2. Schritt
<i>nit-9A</i>^{*2}	V1M5	3935	IVR	Mo Einbau in MPT
<i>nit-9B</i>^{*2}	V1M32	3936	IVR	Mo Einbau in MPT
<i>nit-9C</i>^{*2}	V1M50	3937	IVR	Mo Einbau in MPT

^{*1} *Nit-5* ist ein Allel des *nit-4*-Locus.

^{*2} *Nit-9* ist ein komplexer Locus, der aus drei Komplementationsgruppen besteht (Tomsett und Garret, 1981). Die FGSC-Nummer ist die Klonbezeichnung des Neurospora Stock-Centers.

2. Ergebnisse

2.1 Funktionelle Charakterisierung der MPT-Synthase aus *E.coli*

Im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese wird durch die Katalyse der MPT-Synthase die organische Komponente des Cofaktors das Molybdopterin gebildet. Dazu wird in den schwefelfreien PrecursorZ eine Dithiolengruppe eingeführt, die später für die Komplexierung des Molybdäns verantwortlich ist.

In einer ersten Charakterisierung (Pitterle, 1993) wurde die MPT-Synthase als Heterodimer aus einer großen (MoaE) und einer kleinen Untereinheit (MoaD) beschrieben. Um katalytisch aktiv zu sein, muß eine Aktivierung durch ein weiteres Protein (MoeB) erfolgen. MoaD wurde für die Übertragung des Schwefels verantwortlich gemacht, da ein Größenunterschied der kleinen Untereinheit aus *moaA*- (in dieser Hinsicht dem Wildtyp entsprechend) und *moeB*-Mutanten gezeigt werden konnte. Dieser Unterschied von 16 Da wurde als ein MoeB-abhängiger Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom des Proteins interpretiert (Pitterle, 1993). Abbildung 2.1 zeigt ein frühes Modell dieses Biosyntheseschrittes.

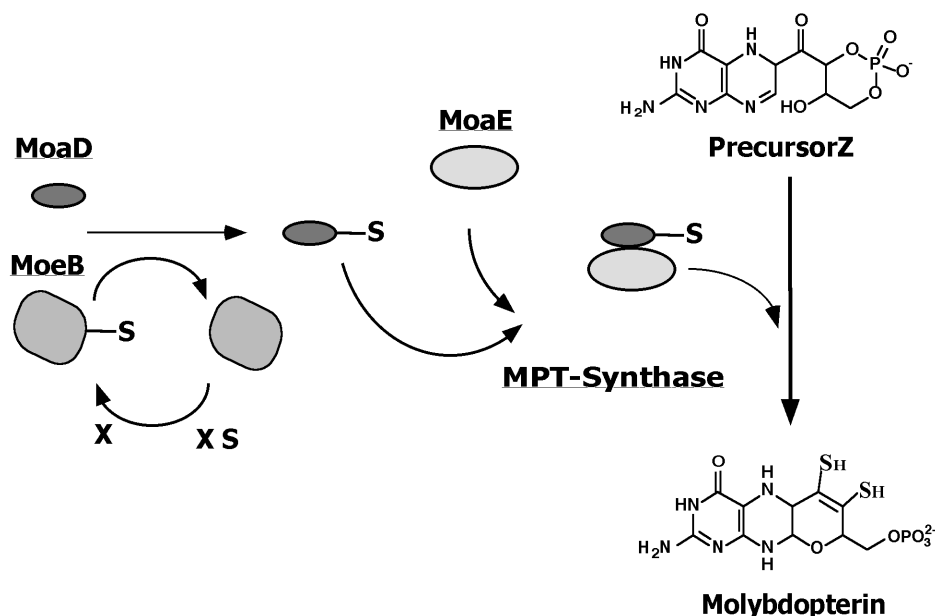


Abb. 2.1 Aktivierung und Assemblierung der MPT-Synthase in *E.coli*

Die MPT-Synthase besteht aus einer großen (MoaE) und einer kleinen Untereinheit (MoaD), welche für ihre katalytische Aktivität sulfuriert werden muß. Diese Reaktion sollte durch MoeB erfolgen. Die MPT-Synthase katalysiert die Reaktion von PrecursorZ zu Molybdopterin.

Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung der aktivierten kleinen Untereinheit und die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der MPT-Synthase.

2.1.1 Die schwefel-aktivierte Form der kleinen Untereinheit

Aminosäuresequenz-Alignments kleiner MPT-Synthase Untereinheiten verschiedener Organismen zeigen eine starke Konservierung des C-Terminus mit einem terminalen Doppelglycin-Motiv. Eine solche C-terminale Glycylglycin-Gruppe ist ebenso charakteristisch für Ubiquitin, hier ist die terminale Aminosäure essentiell für die Anbindung von Ubiquitin an die ubiquitin-aktivierenden Enzyme. Dabei erfolgt die Ligation über die Ausbildung einer Thioesterbindung. In Anlehnung an diese Reaktion wurde postuliert, daß die Anbindung des Schwefels an die kleine Untereinheit der MPT-Synthase über eine Thioesterbindung mit MoeB verläuft. Die aktivierte schwefeltragende kleine Untereinheit würde demzufolge eine Thiocarboxylgruppe am C-Terminus tragen.

Zur Überprüfung dieses Modells wurde das Impact-CN[®] Proteinaufreinigungssystem von New England Biolabs verwendet. Das Zielprotein ist dabei an einen selbstspaltenden Intein-Tag und eine Chitin-Bindungs-Domäne fusioniert, durch deren hohe Bindungsaffinität zu einer Chitin-Matrix eine Aufreinigung des exprimierten Fusionsproteins gewährleistet wird. Die Intein-katalysierte Selbstspaltung verläuft über einen N-S-Acyl-Shift am C-Terminus des Zielproteins wodurch es zur Ausbildung eines Thioesters kommt. Die Thioester-Bindung kann anschließend entweder durch DTT oder (NH₄)₂S gespalten werden (siehe Abb. 2.2 A). Wird DTT verwendet, liegt das aufgereinigte Zielprotein unmodifiziert mit C-terminaler Carboxyl-Gruppe vor, bei Verwendung von (NH₄)₂S entsteht ein C-terminales Thiocarboxylat (Kinsland, 1998). Damit ist es möglich, die kleine Untereinheit sowohl in ihrer inaktiven, als auch in der postulierten aktivierten Variante zu generieren.

2.1.1.1 Klonierung und Expression der kleinen Untereinheit Moad

Die Nukleotidsequenz von *moaD* wurde über die eingefügten Restriktionsstellen *NdeI* und *KpnI* in den Intein-Fusionsvektor pTYB2 kloniert. Die Polylinkerregion des

Vektors sieht eine 3' *Sma*I- „blunt-end“ Klonierung vor. Da sich diese als problematisch herausstellte, wurde im 3' Bereich über die Vektor-interne *Kpn*I-Site kloniert, indem dieser Vektorbereich an den 3' Primer von *moaD* fusioniert wurde. Das hergestellte Konstrukt wurde doppelsträngig sequenziert und zur Expression in den *E.coli* Stamm ER2566 transformiert.

Die Expression von MoaD (8,7 kDa) wurde bei OD₆₀₀ von 0,7 mit 0,5 mM IPTG induziert und für 16 Stunden bei 18 °C fortgesetzt. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte gemäß Vorschrift. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde mit 50 mM DTT induziert, um das carboxylierte Protein zu erhalten. In Abwandlung des Protokolls wurde diese auch mit 50 mM (NH₄)₂S induziert, wobei das thiocarboxylierte Protein entstehen sollte (Abb. 2.2.A). Die Ausbeuten an Protein waren bei beiden Spaltungen vergleichbar, im 15% igen Trycingel verhalten sich beide Proteine identisch (Abb. 2.2 B).

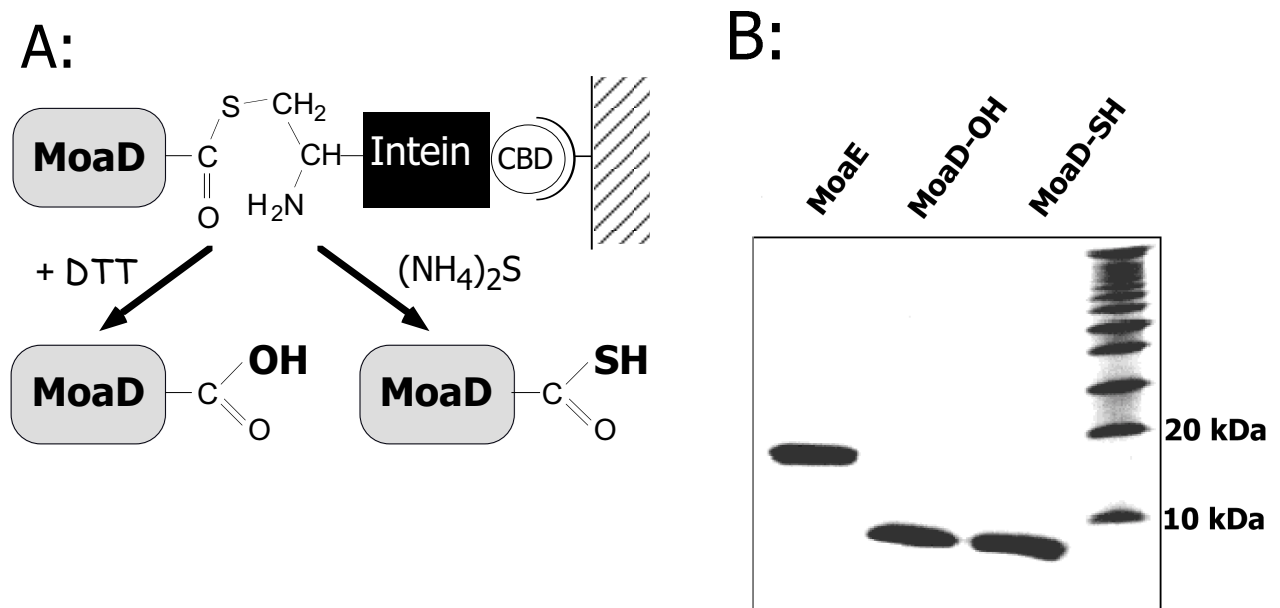


Abb. 2.2 Spaltung und Aufreinigung der Intein-Fusionsproteine

(A) Die Spaltung des MoaD-Fusionsproteins, bestehend aus den drei Domänen MoaD, Intein und Chitinbindungsprotein, wurde durch DTT oder (NH₄)₂S induziert, wobei C-terminal unterschiedliche MoaD Varianten freigesetzt wurden.

(B) SDS-PAGE (15 %iges Trycingel) gereinigter großer Untereinheit (MoaE; 17,8 kDa) und carboxylierter (MoaD-OH) bzw. thiocarboxylierter kleiner Untereinheit (MoaD-SH; 8,7 kDa).

2.1.1.2 Verifizierung des modifizierten C-Terminus von MoaD

Die erfolgreiche Thiocarboxylierung bzw. Carboxylierung der kleinen Untereinheit (MoaD) sollte mittels Massenspektroskopie bestätigt werden (Abb. 2.3). Dazu wurden MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) Messungen der gereinigten Proteine (ca. 100 μ M) durchgeführt. Das hypothetisch thiocarboxylierte Protein (8774,03 Da) sollte durch den Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefel-Atom 16 Da größer sein als das carboxylierte, nicht-modifizierte Protein (8757,94 Da). Die experimentell bestimmte Massendifferenz der beiden kleinen Untereinheiten beträgt 15,74 Da. Auch wenn die absoluten Massen nicht vollkommen mit den theoretischen Werten übereinstimmen, kann der theoretische Unterschied belegt werden, die Abweichungen von ca. 5 Da lagen im Bereich des Meßfehlers. (Abb. 2.3).

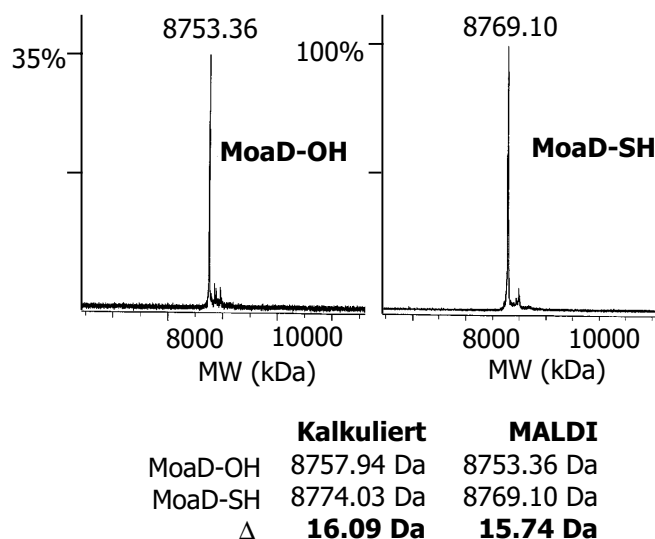


Abb. 2.3 Massenspektroskopische Untersuchung der Intein-gespaltenen MoaD-Varianten

Die kalkulierte Masse der nicht modifizierten kleinen Untereinheit lag bei 8757,94 Da. Das Thiocarboxylat sollte 16,09 Da größer sein. Die MALDI Messungen zeigten leichte Abweichungen, der Größenunterschied war mit 15,74 Da nah am kalkulierten Unterschied. Die Ergebnisse konnten in sechs unabhängigen Messungen bestätigt werden.

2.1.2 Klonierung und Expression der großen Untereinheit (MoaE) der *E.coli* MPT-Synthase

Die Nukleotidsequenz von *E.coli moaE* wurde über die eingefügten Restriktionsstellen *NcoI* und *BglII* in den His-Tag-Vektor pQE60 kloniert und durch doppelsträngige Sequenzierung bestätigt. MoaE (17,8 kDa) wurde rekombinant exprimiert und durch Ni-NTA Chromatographie bis zur Homogenität gereinigt und auf 2 mg/ml ankonzentriert (Abb. 2.2 B).

2.1.3 *In vitro* Assemblierung der bakteriellen MPT-Synthase aus separaten Untereinheiten

Mit den separat exprimierten beiden Untereinheiten der MPT-Synthase sollte diese *in vitro* assembliert und auf Aktivität untersucht werden. Die kleine Untereinheit lag in den zwei beschriebenen Varianten vor, womit der Einfluß des unterschiedlichen C-Terminus auf die MPT-Synthase Bildung untersucht werden sollte.

Die Molekulargewichtsbestimmung beider einzelnen Untereinheiten ergab, daß sie monomerisch vorlagen. Nach fünfminütiger Co-Inkubation von großer und kleiner Untereinheit wurde das Gemisch mittels FPLC (Amersham/Pharmacia) auf einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule chromatographisch bei Flußrate von 0,3 ml/min getrennt. Proben von 200 µl Volumen wurden aufgetragen (0,5 – 8 µM Protein), wobei die beiden Untereinheiten in molaren Verhältnissen von 1:4 bis 4:1 eingesetzt wurden. Zur Molekulargewichts-Bestimmung der assemblierten Proteinkomplexe (Abb. 2.4 D) wurde die Gelfiltrationssäule mit Standard Proteinen kalibriert (siehe Material und Methoden).

Die beiden Proteine assemblierten unabhängig vom Zustand des C-Terminus der kleinen Untereinheit zu einem Komplex, der mit ca. 50 kDa einem Heterotetramer aus zwei kleinen (je 8,7 kDa) und zwei großen Untereinheiten (je 17,8 kDa) entsprach. Bei nicht äquimolaren Verhältnissen ließen sich die überschüssigen Untereinheiten jeweils in ihrer monomeren Form detektieren (Abb. 2.4 A, B und C). Vergleicht man die beiden entstehenden Komplexe der schwefelfreien und schwefelbeladenen MPT-Synthasen miteinander, so läßt sich ein geringer aber signifikanter Unterschied von 0,19 ml im Elutionsvolumen feststellen, der auf geringfügig unterschiedliche Konformation hindeuten könnte (Abb. 2.4 C). Zur

Kontrolle wurde aktive MPT-Synthase aus *E.coli* gelfiltriert, bei der beide Untereinheiten co-exprimiert (pQE60-*moaDE*) und nach Assemblierung gemeinsam über einen an MoaE fusionierten His-Tag aufgereinigt wurden. Diese entsprach dem thiocarboxylierten Komplex. Die Standardabweichungen stammen von 7 unabhängigen Experimenten.

Verringert man die vorangehende Co-Inkubationszeit bis hin zum sofortigen Aufspritzen des Gemisches, so ist kein Einfluß auf die Komplexbildung zu erkennen, was auf eine hohe Affinität der beiden Untereinheiten unter den verwendeten Versuchsbedingungen hindeutet (Daten nicht gezeigt).

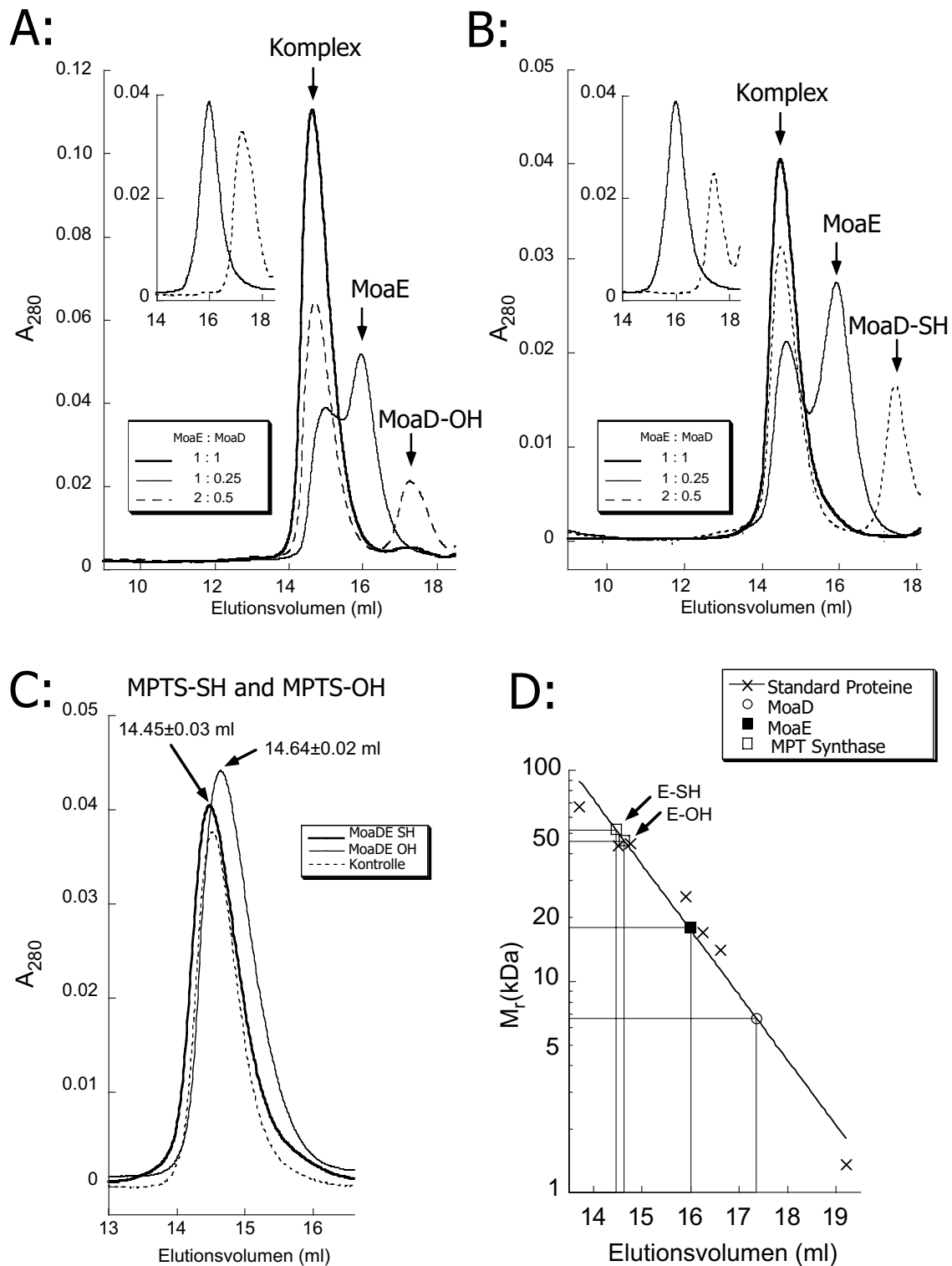


Abb. 2.4 Assemblierung der *E.coli* MPT-Synthase aus ihren Untereinheiten

A und B zeigen Elutionsprofile assemblierter MPT-Synthasen. Monomere kleine und große Untereinheiten (Inlay) assemblierten bei äquimolaren Verhältnissen zu einem heterotetrameren Komplex. Dabei war es irrelevant, ob die kleine Untereinheit carboxyliert (A) oder thiocarboxyliert vorlagen (B). Im Überschuß einer Untereinheit lag diese neben dem Komplex frei vor. Beide Komplexe wiesen einen Elutions-Shift von 0,19 ml auf (C). Das Elutionsvolumen wurde gegen Absorption bei 280 nm (A - C) bzw. gegen den Molekularradius aufgetragen (D). (MoaD-OH=Carboxylat, MoaD-SH=Thiocarboxylat, MPTS-SH/-OH=MPT-Synthase mit und ohne MoaD-Schwefel)

2.1.4 Aktivitätsuntersuchungen der bakteriellen MPT-Synthase

Die assemblierten Komplexe der MPT-Synthase wurden durch Gelfiltration separiert und zu vergleichenden Aktivitätsuntersuchungen ebenso wie die einzelnen Untereinheiten im *nit-1* Rekonstitutions-Assay eingesetzt. Zudem sollte eine *in vitro* Synthese von MPT aus gereinigtem PrecursorZ mittels HPLC-FormA Nachweis gezeigt werden. Die *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* hat einen Defekt im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese und akkumuliert PrecursorZ. Dieser kann durch die Zugabe exogener aktiver MPT-Synthase zu MPT konvertiert werden, in Anwesenheit von 1 mM Molybdat wird Molybdopterin nichtkatalytisch zu Moco umgewandelt und rekonstituiert die *N.crassa* Apo-Nitratreduktase.

Zur Kontrolle wurde ein MPT-Synthase Konstrukt (pQE60*moa*-DE) exprimiert, bei dem beide Untereinheiten bicistronisch im pQE60 Vektor vorlagen und gemeinsam über einen C-terminalen His-Tag der großen Untereinheit aufgereinigt wurden. Diese MPT-Synthase zeigte im *nit-1* Assay Aktivitäten von 8,4 units/pmol gereinigtem Protein (Abb. 2.5 A, Kontrolle). Der schwefelbeladene assemblierte Komplex erreichte sogar 12.3 units/pmol Protein, während der schwefelfreie Komplex nur bei Einsatz der 1000-fachen Proteinmenge schwach meßbare Aktivitäten besaß. In ihrer thio-carboxylierten Form konnte bei der kleinen Untereinheit deutliche Aktivität gemessen werden. Ob diese durch eigene katalytische Aktivität oder durch die Assemblierung mit interner großer Untereinheit aus *N.crassa* zu einem chimären MPT-Synthase Komplex erzielt wurde, sollte im weiteren festgestellt werden. MoaE selbst hatte in Abwesenheit kleiner Untereinheit keine messbare Aktivität im *nit-1* Assay (Daten nicht gezeigt).

Zur genaueren Analyse wurden diese Ergebnisse in einem definierten *in vitro* Assay untersucht und die direkte Konversion von aufgereinigtem PrecursorZ zu MPT chromatographisch an der HPLC verfolgt. Assemblierte aktive MPT Synthase (55 pmol) wurde mit gereinigtem PrecursorZ (1,84 nmol) für eine Stunde inkubiert und das entstandene MPT über sein stabiles Oxidationsprodukt FormA quantifiziert. Es konnten 10,4 pmol MPT nachgewiesen werden (Abb. 2.5 B, Mitte, FormA), während bei Verwendung von thiocarboxyliertem MoaD (50 pmol) (Abb. 2.5 B unten) und im proteinfreien Ansatz (Abb. 2.5, Kontrolle) kein FormA dedektierbar war. Die

im *nit-1* Assay gemessene Aktivität der kleinen Untereinheit scheint damit auf eine Assemblierung mit interner großer Untereinheit aus *N.crassa* zurückzuführen zu sein.

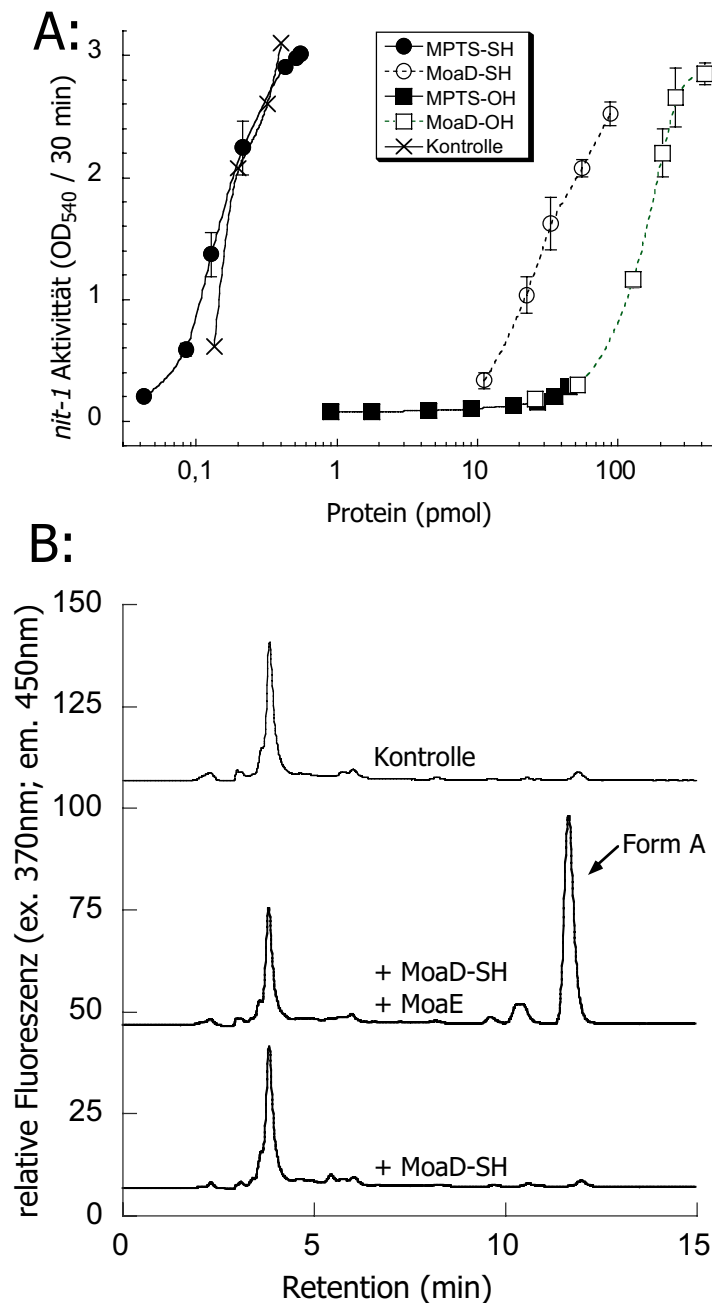


Abb. 2.5 Aktivitätsbestimmungen der *E.coli* MPT-Synthase

MPT-Synthase-Komplexe und ihre Untereinheiten wurden mittels *nit-1* Assay (A) und FormA Nachweis (B) auf ihre Fähigkeit untersucht, MPT zu synthetisieren. (A) Der schwefelbeladene Komplex der MPT-Synthase besaß Aktivitäten, die nativer, *in vivo* gebildeter MPT-Synthase vergleichbar waren, während der schwefelfreie Komplex um den Faktor 1000 schwächer war. (B) FormA ließ sich lediglich bei Verwendung des schwefelbeladenen Komplexes nachweisen. (MoaD-OH = Carboxylat, MoaD-SH = Thiocarboxylat, MPTS-SH/-OH = MPT-Synthase mit/ohne MoaD-Schwefel).

2.1.5 Massenspektroskopische Untersuchung der MPT-Synthase-Reaktion

Zur Verifizierung der gemessenen Aktivitäten sollte die MPT-Synthase-Reaktion mittels massenspektroskopischer MALDI Untersuchungen verfolgt werden. Die kleine Untereinheit MoaD wurde in beiden Varianten jeweils mit und ohne große Untereinheit MoaE bzw. PrecursorZ für eine Stunde inkubiert und danach die Masse der kleinen Untereinheit bestimmt. Dabei konnte eine Größenabnahme der kleinen thiocarboxylierten Untereinheit bei gleichzeitiger Anwesenheit von MoaE und PrecursorZ gezeigt werden. Die Abnahme lag bei 16 Da, das resultierende Protein entsprach damit der Größe des carboxylierten MoaD (Tab.2.1).

Neben der *in vitro* Synthese konnte damit abermals bestätigt werden, daß beide Untereinheiten für die Reaktion benötigt werden und die *nit-1* Aktivität der alleinigen schwefelbeladenen kleinen Untereinheit auf ihre Interaktion mit interner großer Untereinheit des *Neurospora crassa* Systems zurückzuführen war.

Tab. 2.1 Massenspektroskopische Untersuchung der *in vitro* Synthese von MPT mit gereinigten MPT-Synthase Untereinheiten

	MoaE	PrecursorZ	MALDI m/z (Da)*
MoaD-SH	-	-	~ 8774
MoaD-SH	+	-	~ 8774
MoaD-SH	-	+	~ 8774
MoaD-SH	+	+	~ 8757
MoaD-OH	-	-	~ 8757
MoaD-OH	+	-	~ 8757
MoaD-OH	-	+	~ 8757
MoaD-OH	+	+	~ 8757

*) Nach einstündiger Co-Inkubation von MoaD (1 µM) mit äquimolarer Menge MoaE und PrecursorZ (50 µM) in 50 µl wurde 1µl des Ansatzes durch MALDI analysiert (m/z = Masse/Ladungsverhältnis).

2.1.6 Versuche zur Generierung einer heterodimeren MPT-Synthase

Wie gezeigt besteht die MPT-Synthase aus je zwei Untereinheiten der Proteine MoaD und MoaE, die zusammen einen heterotetrameren Komplex bilden. Parallel zu diesen

Arbeiten erfolgte die Aufklärung der Struktur der *E.coli* MPT-Synthase (Rudolph *et al*, 2001), wodurch die Gelfiltrations-Ergebnisse bestätigt wurden. Die beiden großen Untereinheiten bilden ein symmetrisches Dimer. An ihren entgegengesetzten Enden erfolgt jeweils die Interaktion mit einer kleinen Untereinheit (Abb. 2.6).

Für die Reaktion von PrecursorZ zu MPT werden zwei Schwefelatome benötigt, eine kleine Untereinheit liefert aber über ihr Thiocarboxylat nur einen Schwefel. Darüber hinaus liegen die beiden aktiven Zentren der MPT-Synthase räumlich relativ weit voneinander entfernt. Deshalb sollte versucht werden, verschiedene Mutanten (F108A/K37A, M115A, Q112D, Y19A) herzustellen, in denen die Dimerisierungsdomäne der großen Untereinheit so verändert ist, daß MoaE nicht mehr dimerisiert und eine MPT-Synthase entsteht, die nur noch aus einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht. Außerdem sollte eine hypothetische Kooperation der beiden großen Untereinheiten über Aminosäurereste (H103), die jeweils in das aktive Zentrum der anderen großen Untereinheit ragen, unterbunden werden. Die katalytische Beteiligung einer großen Untereinheit an der Reaktion im aktiven Zentrum der anderen großen Untereinheit wäre damit verhindert.

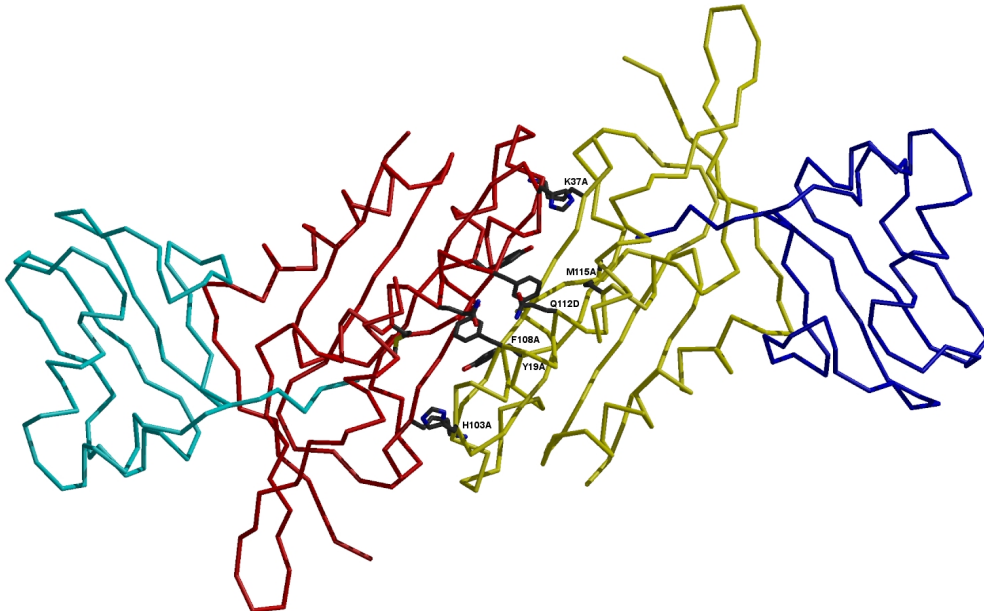


Abb. 2.6 MPT-Synthase Struktur mit hervorgehobenen Seitenketten mutagenisierter Aminosäuren

Die das Dimerisierungs-Interface betreffenden Aminosäuren M115, H103 und Y19 wurden jeweils zu Alanin und Q112 zu Aspartat mutiert. Die Aminosäuren F108/K37 wurden als Doppelmutante in einem Protein zu Alanin getauscht.

Die *moaE* Mutanten wurden mittels Primermutagenese hergestellt und durch doppelsträngige Sequenzierung verifiziert. Im Nitratreduktase-Overlay-Assay wurde unter induzierenden (+IPTG) und nicht induzierenden Bedingungen (-IPTG) ihre Fähigkeit überprüft, die *moaE*-Mutante KB2050 funktionell zu komplementieren. Die Mutanten F108A/K37A, M115A, H103A zeigten eine dem Wildtyp-Protein vergleichbare Färbung, Q112A besitzt mit IPTG keine Aktivität, hat aber leichte Restaktivitäten ohne IPTG. Y19A kann die Mutante nicht mehr komplementieren (Abb.2.7).

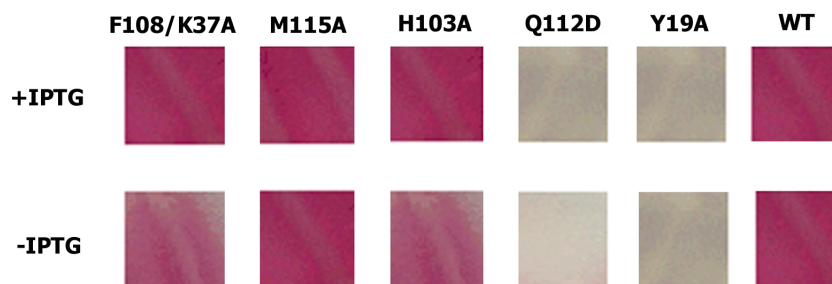


Abb. 2.7 Nitratreduktase Overlay-Assay der *moaE*-Mutanten nach Expression verschiedener MoaE-Formen

Im Overlay-Assay rekonstituieren die Mutanten F108A/K37A, M115A, H103A mit und ohne IPTG die *moaE* Mutante KB2050. Q112A und Y19A sind mit IPTG nicht in der Lage zu komplementieren. Ohne IPTG ist bei Q112A leichte Aktivität zu erkennen. Zum Vergleich ist die homologe Komplementation mit WT-*moaE* gezeigt (jeweils Ausschnitte der Overlay-Platten mit Nitrit-abhängiger Rotfärbung).

Die Expression der Proteine wurde nach Ni-NTA-Aufreinigung überprüft (Abb.2.8), wobei keine Expression der Mutante Q112A und lediglich schwache Expression für Y19A nachweisbar war. Die anderen Mutanten erreichten das Expressionsniveau des Wildtyps.

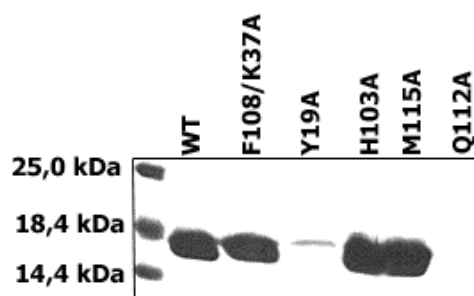


Abb. 2.8 Expression der MoaE-Mutanten

Coomassie gefärbtes 15 % iges SDS-Gel mit aufgereinigtem MoaE und den Mutanten F108A/K37A, Y19A, H103A, M115A sowie Q112A. Es wurden je 50 ml angezogen, gereinigt, positive Fraktionen gepoolt und von insgesamt 2ml je 10 µl aufgetragen.

Mittels Gelfiltration (Superdex200) wurden die Massen der generierten Mutanten der großen Untereinheiten sowie ihrer Komplexe mit thiocarboxylierten kleinen Untereinheiten bestimmt. Dabei konnte aufgrund fehlender Expression die Mutante Q112D nicht analysiert werden. Alle anderen Mutanten verhielten sich ebenso wie das WT-Protein monomerisch, wenn sie ohne MoaD chromatographiert wurden.

Zu einem Komplex assembliert, zeigte die Doppelmutante (F108/K37A) eine verringerte Größe, die mit etwa 30 kDa einem Dimer entsprechen könnte. Anschließende *in vitro* Synthese von MPT (HPLC FormA-Analyse) mit den Proteinkomplexen (1 μ M) und Precursor Z (50 μ M) brachte für die drei untersuchten Mutanten F108A/K37A, M115A und H103A keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp, mit Y19A und Q112D konnte aufgrund der schlechten Expression keine FormA Analyse durchgeführt werden. Tab.2.2 fasst die Charakterisierung der MoaE-Mutanten zusammen.

Tab. 2.2 Charakterisierung der MoaE Mutanten

Mutation	Overlay KB2050 +IPTG	Overlay KB2050 -IPTG	Protein Expression	Größe Superdex	Größe +MoaD-SH Superdex	MPT Synthese <i>in vitro</i>
F108A/ K37A	+	+	++	Monomer	~ 30 kDa (Dimer)	+
M115A	+	+	+++	Monomer	Tetramer	+
Q112D	-	+(?)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H103A	+	+	+++	Monomer	Tetramer	+
Y19A	-	-	(+)	Monomer	Tetramer	N.D.

Zusammenfassung der untersuchten biochemischen Charakteristika der generierten Mutanten (N.D. = nicht durchgeführt).

Bildet die Doppelmutante F108A/K37A tatsächlich einen heterodimeren Komplex der MPT-Synthase, so scheint kein Einfluß auf die MPT-Synthese gegeben zu sein. Weitere Analysen sollten mittels nativer SDS-PAGE und massenspektroskopischer Analyse der PrecursorZ Reaktion erfolgen.

2.1.6.1 Native Gelelektrophorese der MPT-Synthase Untereinheiten und ihrer Komplexe

Das MoaE Wildtyp Protein und die Mutanten F108A/K37A, M115A sowie H103A wurden im nativen 15% igen Gel analysiert. Dabei sollten sie jeweils allein und im äquimolarem Verhältnis mit MoaD assembliert untersucht werden.

Die großen Untereinheiten allein zeigten diffuses Laufverhalten und schienen keine einheitliche Konformation anzunehmen. Bei vorheriger Inkubation mit kleiner Untereinheit änderte sich jedoch das Laufverhalten von MoaE und seinen Mutanten. Unter Versuchsbedingungen dissoziierte während der Elektrophorese ein Großteil der kleinen Untereinheit wieder aus dem Komplex. Zum Vergleich wurde dieselbe Menge des eingesetzten MoaD Proteins separat aufgetragen. Ein Mengenunterschied zu dem aus den Komplexen dissoziierten MoaD ist nicht zu erkennen, MoaE nahm aber nach Inkubation mit MoaD eine einheitliche Konformation an, die in einer distinkten Bande resultierte (Abb. 2.9). Das Wildtyp-Protein unterschied sich von der etwas höher laufenden hypothetisch Dimer-bildenden Mutante F108A/K37A, die Mutante M115A schien in zwei unterschiedlichen Konformationen vorzuliegen, was in einer Doppelbande resultierte (Abb. 2.9).

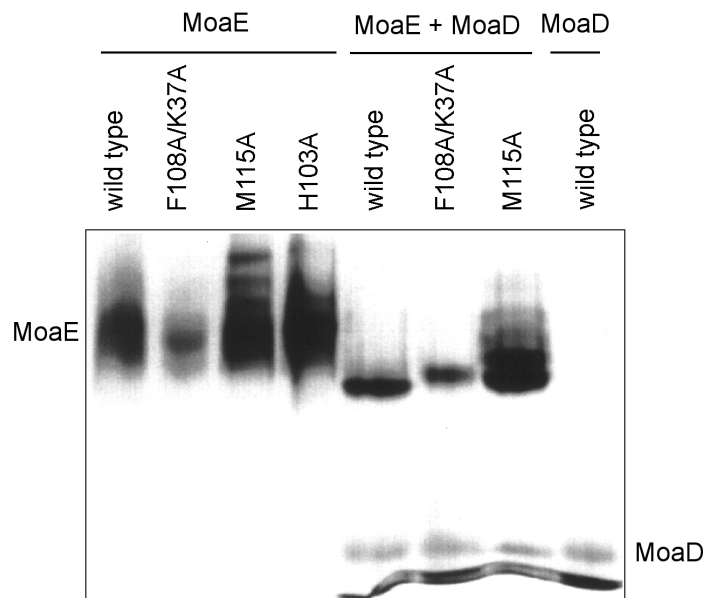


Abb. 2.9 Native Gelelektrophorese der MoaE-Mutanten bzw. ihrer Komplexe mit MoaD

Im nativen 15% igen Gel zeigten die großen Untereinheiten ein diffuses Verhalten, nach Inkubation mit kleiner Untereinheit eine scharfen Bande. Das Laufverhalten von MoaD war durch die zwischenzeitliche Bindung an MoaE nicht beeinflusst (100V Elektrophorese-Spannung, gekühlt bei RT, jeweils 2 μ M Protein).

2.1.7 Spektroskopische Analyse der PrecursorZ Konversion

Nach der Untersuchung des Protein-Teils (MPT-Synthase) der Reaktion von PrecursorZ zu MPT sollte auch die Umsetzung des Substrats genauer analysiert werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, ob der Einbau zweier Schwefelatome in PrecursorZ zu einem Zwischenprodukt mit nur einem Schwefel-Atom führt. Die massenspektroskopischen MALDI Untersuchungen der MPT-Synthase Reaktion (2.1.5) zeigten bereits eine 16 Da Größenabnahme der thiocarboxylierten kleinen Untereinheit in Anwesenheit von großer Untereinheit und PrecursorZ. Mittels ESI-Messungen (electron spray ionisation) sollte versucht werden, die stufenweise Übertragung des Schwefels auf den Precursor zu zeigen. Grundlegende Voraussetzung für diese Versuche war es, PrecursorZ in ausreichender Menge und Reinheit für die Meßmethode zur Verfügung zu stellen, was jedoch problematisch war. Aufgereinigte PrecursorZ Fraktionen (nach Wuebbens und Rajagopalan 1993) waren zwar biologisch aktiv, die aufgenommenen Spektren zeigten jedoch reproduzierbar leichte Abweichungen zum veröffentlichten Originalspektrum. Die Fraktionen wurden mittels HPLC isokratisch in 2% Essigsäure an einer C-18-Säule, die an ein ESI-Spektrometer angeschlossen war, getrennt. Mit dieser vorgeschalteten nochmaligen HPLC-Trennung konnte im Vergleich zu einer Negativkontrolle (Abb.2.10 unten), die unter denselben Bedingungen aufgearbeitet wurde, nach 3,5 min ein dem PrecursorZ entsprechender Peak von 346 Da nachgewiesen werden (Abb.2.10 oben). Allerdings war die Intensität so gering, daß lediglich eine Computer-Isolierung von Massenpeaks von 346 +/- 2 Da dieses Ergebnis zeigte. Blendet man die anderen Massenpeaks wieder ein, so sind Verunreinigungen anderer Stoffe dominant (Abb. 2.10 Inlay).

Somit konnte zwar die in den *in vitro* Synthesen gezeigte Anwesenheit von PrecursorZ gezeigt werden, Menge und Reinheit erlaubten aber keine nähere Analyse der Reaktion. Weitere Versuche, PrecursorZ zu konzentrieren oder die Meßmethodik zu optimieren, brachten keine verbesserten Meßergebnisse.

Die Untersuchung der Reaktion von PrecursorZ zu MPT und damit verbunden die Frage nach der Existenz eines nur einen Schwefel tragenden neuen Zwischenprodukts konnten damit nicht abschließend beantwortet werden.

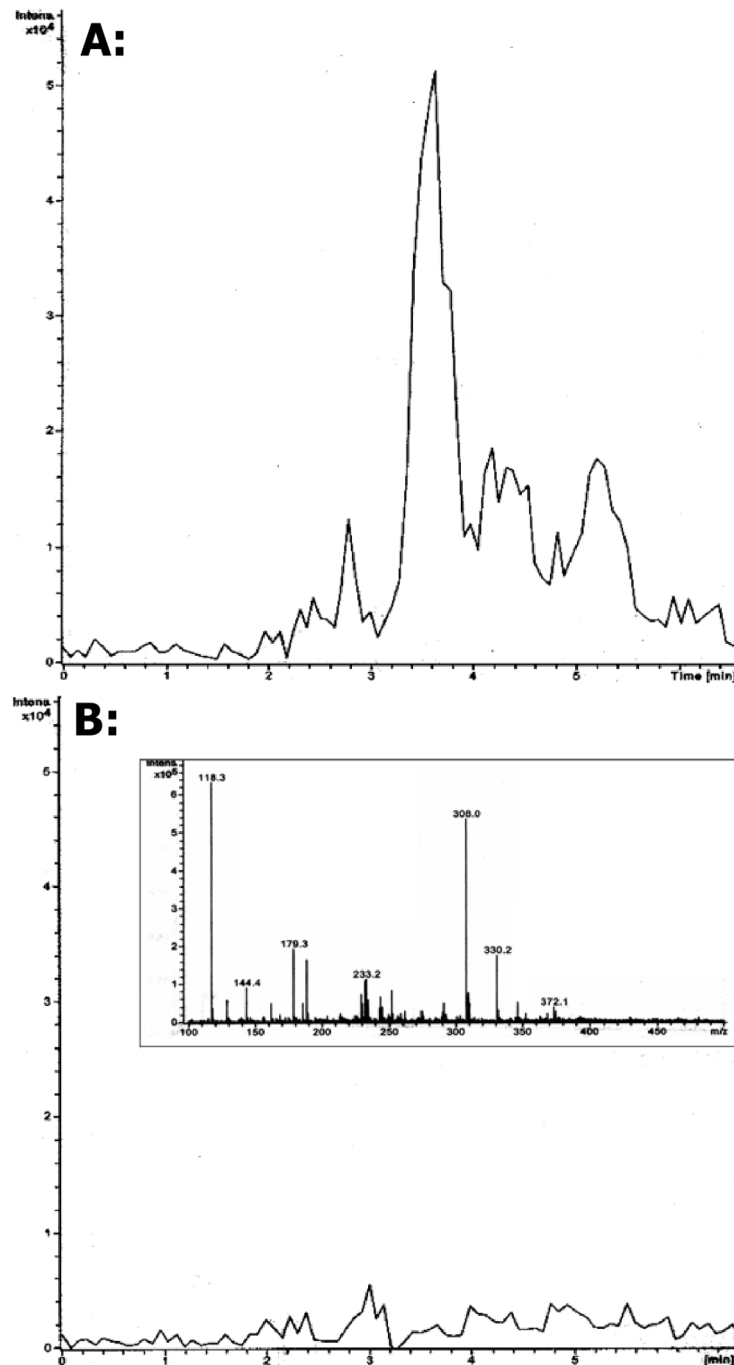


Abb. 2.10

ESI-Massenspektroskopie von gereinigtem PrecursorZ

Im oberen Teil der Abbildung ist die Isolierung von 346 Da großen Massen über die Zeit des HPLC-Laufes aufgetragen. Im Vergleich der PrecursorZ enthaltenden Probe (A) zu einer Negativkontrolle (B) war ein Peak bei 3,5 min zu erkennen. Diese Fraktion konnte durch MPT-Synthese in MPT umgewandelt werden. Blendet man die anderen nicht isolierten Massen mit ein (Fenster in B), ist auffällig, daß die Masse von 346 Da lediglich eine unterrepräsentierte Verbindung der Probe darstellt.

2.2 Untersuchungen zur Schwefelquelle der MPT-Synthase-Reaktion in *E.coli*

Zur Bildung der Dithiolengruppierung wird Schwefel von der MPT-Synthase auf PrecursorZ übertragen. Die Quelle dieses Schwefels ist unbekannt. MoeB ist essentiell für die Bildung des Thiocarboxylats, da eine Mutation dieses Gens zu inaktiver kleiner Untereinheit führt (Pitterle, 1993). Aus der Aminosäure-Sequenz des *E.coli* Proteins ergeben sich keine Hinweise auf eine Sulfurase-Aktivität von MoeB, eine potentielle ATP-Bindungsstelle spricht vielmehr für eine ATP-abhängige Aktivierung der kleinen Untereinheit. Leimkühler (2001) konnte eine Adenylierungsfunktion von MoeB belegen. Mit der Aufklärung der Struktur eines Komplexes zwischen MoeB und der kleinen Untereinheit konnte die ATP-abhängige Adenylierung von MoaD endgültig demonstriert werden (Lake *et. al.* 2002). Demzufolge liegt die Vermutung nahe, daß ein weiteres, bisher nicht charakterisiertes Protein an der Schwefel-Mobilisierung und Weitergabe beteiligt ist.

Der Cysteindesulfurase IscS (Iron-Sulfur-Cluster-Synthesis Protein S) wurde eine Rolle als universeller Schwefel-Donor diverser Stoffwechselwege zugeschrieben. Bei Untersuchungen des Schwefeleinbaus innerhalb der Thiaminbiosynthese konnte die Beteiligung dieses Schwefel-mobilisierenden Enzyms gezeigt werden (Lauhon, 2000). Da die hieran beteiligten Proteine ThiF und ThiS signifikante Homologien zu den Molybdäncofaktor-Biosyntheseproteinen MoeB und MoaD aufweisen, sollte IscS hinsichtlich seiner Bedeutung für die Moco-Biosynthese charakterisiert werden.

2.2.1 Charakterisierung einer *iscS*-Mutante

Die zur Untersuchung der Schwefel-Übertragung auf einen Thiazol-Precursor während der Thiaminbiosynthese generierte *iscS*-Mutante CL100*iscS*⁻ (Lauhon 2000) wurde hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Moco-Biosynthese untersucht. Um die Aktivität des Molybdoenzyms Nitratreduktase in der *iscS* Mutante qualitativ *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Overlay-Assay durchgeführt. Die Mutante wurde ÜN bei 37°C angezogen, als Kontrolle diente der korrespondierende *E.coli*-Wildtypstamm MC1061. Wie in Abb. 2.11 zu sehen ist, zeigte die Mutante keine Färbung und besitzt demzufolge keine aktive Nitratreduktase. Der Wildtypstamm zeigte dagegen die bei intakter Nitratreduktase erwartete Pinkfärbung.

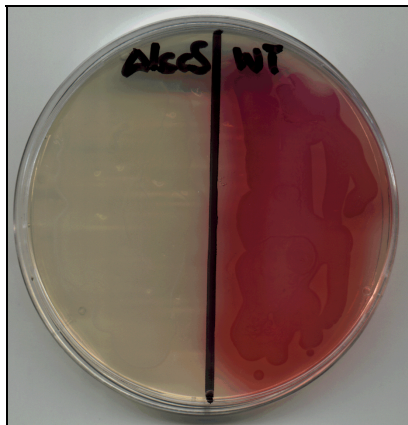


Abb. 2.11 Overlay-Assay der *iscS*-Mutante CL100/*iscS*⁻ mit korrespondierendem Wildtyp MC1061

Die Mutante (links) besaß im Gegensatz zum Wildtyp (rechts) keine Nitratreduktase-Aktivität.

Anzuchtbedingungen: 37°C, ÜN., aerob, anschließend 2h anaerobe Induktion der NR.

2.2.1.1 Untersuchungen der endogenen MPT-Synthase Aktivität der *iscS*-Mutante

Um zu untersuchen, ob das Apo-Protein oder der Kofaktor für den Ausfall der Nitratreduktase verantwortlich ist, wurden Rohextrakte der Mutante als MPT-Synthasequelle im *nit-1* Assay eingesetzt. Der aus der *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* gewonnene Extrakt akkumuliert PrecursorZ, da eine Mutation in einem Protein des zweiten Schritts der Moco-Synthese vorliegt (siehe auch 2.6.2). Somit ist keine aktive MPT-Synthase vorhanden, die PrecursorZ zu MPT umwandeln kann. Wird externe aktive MPT-Synthase zugegeben, kann PrecursorZ zu MPT umgesetzt werden. Zusätzlich wird dem Ansatz Molybdat zugefügt, um das entstehende MPT nichtkatalytisch zu Moco umzusetzen, welcher dann die NR rekonstituiert.

Neben aufgereinigter MPT-Synthase wurden verschiedene *E.coli* Stämme als Positiv- und Negativ-Kontrollen in unterschiedlichen Rohextrakt-Konzentrationen (100 µg, 500 µg und 1000 µg) zur Rekonstitution eingesetzt (Anzuchtbedingungen: aerob, 37°C, ÜN). Die Positivkontrollen der verschiedenen WT-Stämme (DH5α; MC1061) zeigten deutliche Pinkfärbung. Die Negativkontrolle (MJ7*chN*) weist einen Defekt in MoeB auf und besaß, wie hier anhand der ausbleibenden Färbung zu erkennen, keine aktive MPT-Synthase. Im Rohextrakt der *iscS*-Mutante CL100/*iscS*⁻ ließ sich unter aeroben Anzucht-Bedingungen keine aktive MPT-Synthase nachweisen (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 MPT-Synthaseaktivität verschiedener *E.coli* Extrakte im *nit-1* Rekonstitutions-Assay

MPT-Synthase-Quelle	OD ₅₄₀			
	100 µg	500 µg	1000 µg	0,01 µg
DH5α	1,20	1,76	2,98	N.D.
MC1061	0,93	1,49	2,78	N.D.
CL100<i>iscS</i>⁻	0,02	0,04	0,07	N.D.
MJ7<i>chN</i>	0,01	0,04	0,03	N.D.
MPT-Synthase	N.D.	N.D.	N.D.	1,36

E.coli Rohextrakte wurden auf MPT-Synthase-Aktivität im *nit-1*-Assay getestet, die *moeB* und *iscS*-Mutante enthielten aerob angezogen keine aktive MPT-Synthase. Gemessen wurde rekonstituierte NR-Aktivität über Nitrit-abhängige Diazofarbstoff-Bildung bei OD₅₄₀.

2.2.1.2 Induktion der internen MPT-Synthase der *iscS*-Mutante

Die *iscS*-Mutante und ihr korrespondierender Wildtyp MC1061 wurden unter verschiedenen Bedingungen (aerob/anaerob) angezogen und der MPT-Gehalt mittels HPLC-FormA-Analyse getestet.

Die MPT-Messungen ergaben eine deutliche Reduzierung des MPT-Gehalts der *iscS*-Mutante unter verschiedenen Bedingungen (Abb. 2.12). Aerob angezogen (37°C, ÜN) ist in der Mutante kein MPT nachweisbar (Wildtyp 128,84 pmol MPT), dies deckt sich mit den MPT-Synthase-Aktivitätsmessungen. Induziert man verschiedene Molybdoenzyme, so liegt der MPT-Gehalt in Bezug zum Wildtyp bei induzierter Nitratreduktase (anaerob, 37°C, ÜN, +0,5% KNO₃) bei 6,6% (12,12 pmol MPT, Wildtyp 183,4 pmol MPT) und bei induzierter DMSO-Reduktase (anaerob, 37°C, ÜN, +0,5% DMSO) bei 25,0% (45,44 pmol, Wildtyp 183,4 pmol MPT).

Über den Nachweis des Produkts der MPT-Synthase konnte gezeigt werden, daß die aerob angezogene Mutante keine MPT-Synthase-Aktivität besitzt, sie jedoch unter induzierenden Bedingungen in der Lage ist, aktive endogene MPT-Synthase herzustellen.

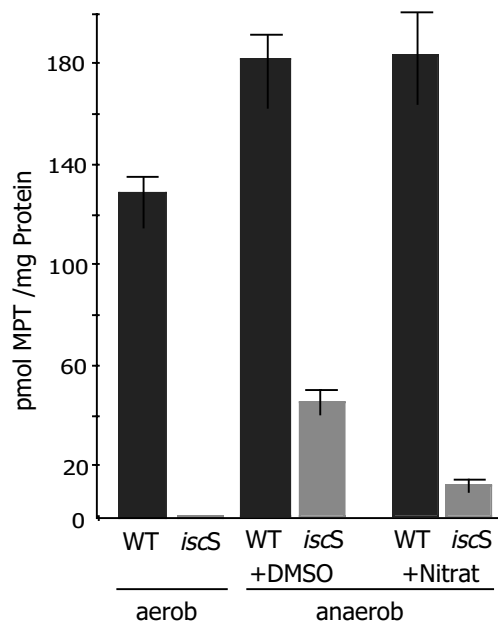


Abb. 2.12 MPT-Messungen der *iscS*-Mutante unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

Je 50 ml Kultur wurden aerob oder anaerob mit DMSO bzw. NO_3^- als terminalem Elektronenakzeptor ÜN angezogen und die MPT-Menge im Rohextrakt mittels HPLC-FormA-Analyse quantifiziert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus je drei Messungen zweier aufgearbeiteter Zellpellets.

2.2.1.3 Expression der *E.coli* MPT-Synthase in der *iscS*-Mutante

Um die Fähigkeit der *iscS* Mutante zur Bildung aktiver MPT-Synthase direkt zu zeigen, sollte die *E.coli* MPT-Synthase in dieser Mutante exprimiert, aufgereinigt und funktionell charakterisiert werden. Auffällig war, daß die *iscS* Mutante nach der Transformation mit pQE60*moaDE*/pRep4 ein stark vermindertes Wachstum auf LB-Selektionsmedium (LB + Ampicilin + Kanamycin) zeigte. Deutlich erkennbare Kolonien wurden erst nach einer Inkubationszeit von über 20 h sichtbar. Zur Kontrolle wurde das Vorhandensein der entsprechenden Plasmid-DNA in den Transformanten über Reinigung und Sequenzierung bestätigt.

Mit der transformierten Mutante wurde eine Expressionskinetik durchgeführt, um die optimalen Expressionsbedingungen der MPT-Synthase festzustellen. Als Parameter wurden verschiedene Induktions-Zelldichten (OD_{600} 0,2; 0,5; 0,7; jeweils mit 1 mM IPTG), Temperaturen (20°C; 30°C; 37°C) und Wachstumszeiten (3 h; 5 h; ÜN) kombiniert. Von den 27 unterschiedlich angezogenen Kulturen wurden je 5 ml geerntet, extrahiert und 30 μl des löslichen Proteinextrakts auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Zum Nachweis der MPT-Synthase wurde ein Western-Blot durchgeführt.

Die Signale der großen Untereinheit im Western zeigen die besten Expressionsbedingungen in der *iscS*-Mutante bei einer Induktions-OD₆₀₀ von 0,5 und einer Expression über Nacht bei 37°C (Ausschnitt der Expressionskinetik Abb. 2-13).

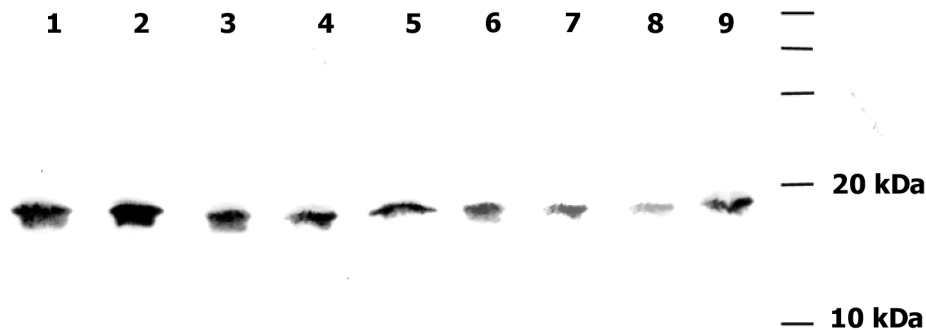


Abb. 2.13 Ausschnitt des Western-Blots der MPT-Synthase Expressionskinetik in der *iscS* Mutante

Expressionstest der MPT-Synthase in der *iscS* Mutante, die Spuren 1–3 zeigen die Expression bei 37°C, ÜN, Induktions- OD₆₀₀ 0,2;0,5;0,7.

Die Spuren 4–6 zeigen die Expression bei 37°C, 5h, Induktions- OD₆₀₀ 0,2;0,5;0,7. Die Spuren 7–9 zeigen die Expression bei 37°C, 3h, Induktions- OD₆₀₀ 0,2;0,5;0,7.

Die sich aus der Expressionskinetik ergebenden optimalen Bedingungen zur MPT-Synthase-Expression in der *iscS*-Mutante wurden gewählt, um die MPT-Synthase zu reinigen. Das aufgereinigte Protein wurde im *nit-1* Assay eingesetzt und mit MPT-Synthase aus *E.coli* Wildtyp-Zellen, die unter identischen Bedingungen exprimiert wurde, verglichen, um eine quantitative Aussage über die Aktivitäten treffen zu können. Bei Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen konnte für die überexprimierte MPT-Synthase der *iscS*-Mutante eine deutliche, wenn auch gegenüber dem Wildtyp verminderte Nitratreduktaseaktivität von ca. 40% nachgewiesen werden. Bereits im Rohextrakt der Mutante war eine MPT-Synthase-Aktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigt die vorangegangenen Untersuchungen. Interne MPT-Synthase-Aktivität war bei aeroben Anzuchtbedingungen nicht nachweisbar, die Mutante ist jedoch in der Lage, aerob überexprimierte MPT-Synthase in aktiver Form zu generieren und unter induzierenden anaeroben Bedingungen auch fähig, endogene aktive MPT-Synthase zu generieren. Damit kommt *IscS* zumindest nicht als alleiniger Schwefel-Lieferant für die Moco-Biosynthese in Frage, redundante Aktivität ist aber nicht ausgeschlossen.

2.2.1.4 Identifizierung eukaryontischer IscS Proteine

Da eine funktionelle Beteiligung von IscS an der Moco-Biosynthese in Prokaryonten nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die Existenz von homologen Proteinen in beispielhaften Eukaryonten untersucht. In Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) und Säugern (*Homo sapiens*) konnten mit Hilfe von Datenbankanalysen zu *E.coli* IscS homologe Proteine nachgewiesen werden. In *Arabidopsis* und dem Menschen existieren zu 55 bzw. 56% identische Proteine zu *E.coli* IscS. Das pflanzliche Protein (Accession Nr. AL021684) besitzt dabei im Vergleich zum bakteriellen eine N-terminale Extension von 50 Aminosäuren das humane (Accession Nr. AF097025) eine Extension von 54 Aminosäuren. Da beide Gene intronfrei sind, wurde die Sequenz aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert und zur Kontrolle sequenziert. Die Abb. 2.14 zeigt die beiden eukaryontischen Aminosäuresequenzen im Alignment mit *E.coli* IscS.

Nähere Untersuchungen der eukaryontischen IscS-Vertreter fanden nicht statt. Der hohe Homologiegrad deutet aber auf funktionelle Identität hin. Sollte sich die Beteiligung von IscS an der prokaryontischen Moco-Biosynthese bestätigen lassen, so ist eine äquivalente Funktion der eukaryontischen Vertreter anzunehmen. Die N-terminalen Extensionen könnten Leadersequenzen darstellen, deren Zielkompartiment anhand von Computeranalysen nicht eindeutig vorhergesagt werden kann. Da allerdings für Eukaryonten eine cytoplasmatische Lokalisierung der Moco-Biosynthese erwartet wird, erscheint die (hypothetische) räumliche Trennung der Proteine als wenig wahrscheinlich.


```

      . . . .10 . . . .20 . . . .30 . . . .40 . . . .50
E.coli_IscS      :.....:
Human_IscS      1:MLLRVAWRRRAAVATAAPGPKPAAPTRGLRLRVGDRAPQSAVPADTTAAP: 50
Plant_IscS      1:....MASKVISATIRRTLTKPHGTFSRCRYLSTAAAAATEVNYEDESIMMK: 46

      . . . .60 . . . .70 . . . .80 . . . .90 . . . .100
E.coli_IscS      1:....MKLPYLDYSATTPVDPRVAEKMMQFMTMDGTFGNPASPSSHRFGWQ: 46
Human_IscS      51:EVGPVLRPLYMDVQATTPLDPRVLDAMLPLYLIN..YGNPHSRTHAYGWE: 98
Plant_IscS      47:GVRISGRPLYLDMQATTPIDPRVFDAMNASQIH..EYGNPHSRTHLYGWE: 94

      . . . .110 . . . .120 . . . .130 . . . .140 . . . .150
E.coli_IscS      47:AEAAVDIARNQIADLVGADPREIVFTSGATESDNLAIKGAANFYQKKGKH: 96
Human_IscS      99:SEAAMERARQQVASLIGADPREIIFTSGATESNNIAIKGVARFYRSRKKH:148
Plant_IscS      95:AEAAVENARNQVAKLIEASPKELVFVSGATEANMAVKGVMHFYKDTKKH:144

      . . . .160 . . . .170 . . . .180 . . . .190 . . . .200
E.coli_IscS      97:ITTSKTEHKAFLDTCRQLEREGFEVTVLPQRNGIIDLKELEAAAMRDDTI:146
Human_IscS      149:LITTOTEHKCVLDSCRSLAEAGFQVTVLPVQKSGIIDLKELEAAIQPDTS:198
Plant_IscS      145:VITTOTEHKCVLDSCRHLQEGFEVTVLPVKTDGLVDLELRBAIRPDTG:194

      . . . .210 . . . .220 . . . .230 . . . .240 . . . .250
E.coli_IscS      147:LVSIMHVNNEIGVVDTAATGEMCRAGTIYHVDAATQSVGKLPIDLSQLK:196
Human_IscS      199:LVSVMTVNNEIGVQPIAEIGRICSSRKVYFHTDAAQAVGKIPLDVNDMK:248
Plant_IscS      195:LVSIMAVNNEIGVQPMEEIGMICKEHNVFHTDAAQAIGKIPVDVKKWN:244

      . . . .260 . . . .270 . . . .280 . . . .290 . . . .300
E.coli_IscS      197:VDLMSFSGHKIYGPKGIGALVVRKPRVRTEAQMHGCGHERGMRSGLTPV:246
Human_IscS      249:IDLMSISGHKIYGPKGVGAIYIRRRPRVRVEALQSGGQGERGMRSGLTPT:298
Plant_IscS      245:VALMSMSAHKIYGPKGVGALVVRRRPRIRLEPLMNGGQERGLRSGLTPT:294

      . . . .310 . . . .320 . . . .330 . . . .340 . . . .350
E.coli_IscS      247:HQIVGMCGEAYRIAKEEMATEMERIRGLRNRLWN.GIKDIEEYVINGDLEH:295
Human_IscS      299:PLVVGLCAACEVAQOEMEYDHKRISKLSERLIQNIKSLPDMVMNGDPKH:348
Plant_IscS      295:QQIVGFCAACELAMKEMEYDEKWIKGLQERLLNGVREKLDGVVNGSMD:344

      . . . .360 . . . .370 . . . .380 . . . .390 . . . .400
E.coli_IscS      296:GAPNILLNVSFNVVEGESLLMALKDLAVSSGSACTASASLEPSYVLRALGIN:345
Human_IscS      349:HYPGCINLSFAYVEGESLLMALKDVALSSGSSCSLHPWSPMLCLEQLALM:398
Plant_IscS      345:RYVGNLNLSPFAYVEGESLLMGLKEVAVSSGSACTASASLEPSYVLRALGVD:394

      . . . .410 . . . .420 . . . .430 . . . .440 . . . .450
E.coli_IscS      346:DELAHSSIRFSLGRFTTEEEIDYTTIELVRKSIGRLRDLSPLEWEMKQGV:395
Human_IscS      399:RIYSHSSIRFGIGAFTEEEVDYTVKCIQHVNRLREMSPLYEMVQDGID:448
Plant_IscS      395:EDMAHTSIRFGIGRFTTKKEEIDKAVELTVKQVEKLREMSPLYEMVKEGID:444

E.coli_IscS      396:INSIEWAHH:404
Human_IscS      449:TKSIKWTOH:457
Plant_IscS      445:TKNIQWQOH:453

```

Abb. 2.14 Alignment IscS homologer Proteine

Das Alignment zeigt die Sequenz des bakteriellen (E.coli_IscS; Accession Nr. AX000472), humanen (Human_IscS; Accession Nr. AF097025) und pflanzlichen IscS Proteins (Plant_IscS; Accession Nr. AL021684) im Vergleich. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. *A. thaliana* IscS besitzt am N-Terminus eine Extension von 50, das humane Protein eine Extension von 54 Aminosäuren.

2.3 Charakterisierung der eukaryontischen MPT-Synthase-Reaktion in *A.thaliana*

Die am zweiten Schritt der Moco-Biosynthese beteiligten Gene der MPT-Synthase-Untereinheiten (*cnx6* und *cnx7*) und des zu MoeB homologen Gens (*cnx5*) lagen durch ihre Identifizierung in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits kloniert vor (Nieder, 1999 und Riedel, 1997). Nieder (1999) konnte dabei in Two Hybrid Protein-Interaktionsstudien eine Interaktion der kleinen Untereinheit Cnx7 mit der großen Untereinheit Cnx6 bzw. dem MoeB-homologen Cnx5 zeigen. Die postulierte funktionelle Beteiligung der isolierten Genprodukte an der Biosynthese basierte jedoch nur auf der Homologie zu den entsprechenden *E.coli* Proteinen. Eine Komplementation korrespondierender *E.coli* Mutanten durch heterologe Expression der pflanzlichen cDNAs blieb ebenso wie Aktivitätsmessungen im eukaryontischen *nit-1* Assay aus. Diese Ergebnisse wurden durch komplexe Proteininteraktionen innerhalb dieses Biosyntheseabschnitts erklärt. Neben den eigentlichen katalytischen Aktivitäten der Proteine müßten für eine erfolgreiche Komplementation einer Mutante die verbliebenen funktionellen *E.coli* Proteine mit dem heterolog exprimierten pflanzlichen Protein interagieren.

Um diese Theorie zu untersuchen, sollten die Komplementationen durch Co-Expression von zwei bzw. drei Proteinen wiederholt werden. Dabei sollte zum einen die pflanzliche MPT-Synthase (Cnx6 und Cnx7) in den entsprechenden bakteriellen Mutanten (*moaD*, *moaE*) exprimiert werden, zum anderen sollten durch die zusätzliche Expression von *cnx5* alle drei pflanzlichen Komponenten in die korrespondierenden Mutanten (*moaD/E*, *moeB*) gebracht werden. Außerdem sollte die "Intein-Methodik" analog zur *E.coli* MPT-Synthase angewendet werden, um potentiell aktivierte kleine Untereinheit zu generieren und pflanzliche MPT-Synthase aus ihren Untereinheiten zu assemblieren.

2.3.1 Komplementation von *E.coli* Mutanten des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese

Zuerst wurden Versuche wiederholt, eine Komplementation von *E.coli* Mutanten des zweiten Schritts durch die einzelne Expression der entsprechenden pflanzlichen Proteine zu erzielen. Dazu wurde nicht auf bereits vorliegende Expressions-

Konstrukte (Nieder, 1999) zurückgegriffen, sondern die cDNAs wurden neu kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

2.3.1.1 Rekonstitution der Nitratreduktase-Aktivität in *E.coli* Mutanten

Durch die Expression von Cnx5- und Cnx7 konnte keine rekonstituierte Nitratreduktase-Aktivität gemessen werden. Mit *cnx6* wurde dagegen eine Komplementation von *moaE*-Mutanten (KB2050 und RK5216) erreicht und damit der erste Beweis für die funktionelle Beteiligung von Cnx6 am zweiten Schritt der Moco-Biosynthese erbracht (Tab. 2.4). Gründe für eine ausbleibende Komplementation in früheren Versuchen könnten in übersehenen Mutationen des damaligen Expressionskonstruktes zu suchen sein.

Ein bicistronisches Expressionskonstrukt der pflanzlichen MPT-Synthase wurde in der Diplomarbeit von Orlich (1999) hergestellt. Dabei wurden die Sequenzen von *cnx7* und *cnx6* mit dazwischengeschalteter Shine Dalgarno-Sequenz durch PCR fusioniert und in den Expressionsvektor pQE60 kloniert (pQE60-*cnx6/7*). Dieses Konstrukt gestattet die gleichzeitige Expression von kleiner und großer Untereinheit der pflanzlichen MPT-Synthase in *E.coli*.

Die *E.coli* Mutanten KB2047 (Mutation der kleinen Untereinheit), KB2050, RK5216 (Mutationen der großen Untereinheiten), RK5203 (beide Untereinheiten defekt) und RK5211 (beide Untereinheiten defekt) wurden mit dem pQE60-*cnx6/7* Plasmid transformiert und im Overlay Assay auf rekonstituierte Nitratreduktaseaktivität überprüft. Nur in den *moaE*-Mutanten war eine Komplementation möglich, während in der Kontrolle durch bicistronische Expression der homologen bakteriellen MPT-Synthase in allen MPT-Synthase-Mutanten NR-Aktivität wiederhergestellt wurde (Tab. 2.4).

Um eine Dreifachkomplementation durch zusätzliche Cnx5-Expression durchzuführen, wurde die *cnx5* cDNA in pQE32 kloniert und die Resistenzkassette mittels Transposon-Mutagenese verändert. Dazu wurde das GPS-System von New England Biolabs benutzt. Das Plasmid pGPS2 enthält ein Transposon, das nach Inkubation mit einer Transposase aus dem Vektor springen und wahllos in die Zielsequenz integrieren kann. Da das Transposon eine Chloramphenicol-Resistenz Kassette trägt,

wurde nach pQE32-Vektoren gescreent, bei denen die integrierte Chloramphenicol-kassette die originäre Ampicillinresistenz von pQE32 zerstört hat.

Unter 50 getesteten Klonen konnte ein einziger Vektor isoliert werden, bei dem das Integrationsereignis innerhalb des Ampicillinresistenzgens lag (Ergebnis nicht gezeigt). Nach der Transformation dieses Konstrukts in bereits mit den pflanzlichen MPT-Synthase-Genen (pQE60-*cnx6/7*) versehenen Mutanten wurde erneut ein Komplementationstest durchgeführt. Eine gegenseitige Behinderung der Vektor-Replikation durch identische Replikationsursprünge konnte durch die Plasmidisolierung aller Vektoren aus den entsprechenden Klonen ausgeschlossen werden. Die Proteinexpression der MPT-Synthase konnte mittels Western gezeigt werden (Daten nicht gezeigt), die Expression von Cnx5 war nicht eindeutig zu belegen. Generell ist Cnx5 in *E.coli* fast nur in unlöslicher Form zu exprimieren (Daten nicht gezeigt).

Der durchgeführte Komplementationstest erbrachte erstmals neben den *moaE*-Mutanten auch in einer *moaD*- und einer *moeB*-Mutante eine schwache Färbung im Overlay (Tabelle 2.4; siehe auch Abb. 2.25). Damit waren Cnx5, Cnx6 und Cnx7 in der Lage, nach Coexpression in *E.coli* aktive MPT-Synthase und damit MPT zu bilden.

Tab. 2.4 Übersicht der Komplementation im qualitativen Overlay-Assay

Overlay-Nitratreduktase Aktivität nach Expression von:					
	<i>cnx6</i>	<i>cnx7</i>	<i>cnx6/7</i>	<i>cnx5</i>	<i>cnx5/6/7</i>
<i>moaE</i> Mutanten					
KB2050	+	N.D.	+	N.D.	+
RK5216	+	N.D.	+	N.D.	+
<i>moaD</i> Mutante					
KB2047	N.D.	-	-	N.D.	(+)
<i>moaE/D</i> Mutanten					
RK 5211	N.D.	N.D.	-	N.D.	(+)
RK5203	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
<i>moeB</i> Mutanten					
MJ7chlN	N.D.	N.D.	N.D.	-	(+)
IL4000	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.

N.D. steht für nicht durchgeführte Komplementationsversuche, (+) steht für Rotfärbung durch rekonstituierte Nitratreduktase-Aktivität, (-) bedeutet keine Rotfärbung durch ausbleibende Komplementation.

Die Färbung im Overlay der Mutanten KB2050, RK5211 und MJ7*chN*, die mit Cnx5, Cnx6 und Cnx7 komplementiert wurden, war nur schwach und nur an Stellen dichten Bakterienwachstums zu erkennen, so daß die NR-Aktivität im Nachfolgenden quantifiziert wurde.

Zur quantitativen Bestimmung der rekonstituierten Nitratreduktase-Aktivität wurde der spektroskopische Nitratreduktase-Assay eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm MC4100, dessen Aktivität (1,3 µmol Nitrit/min/mg Protein) auf 100% gesetzt wurde. Sowohl die untransformierte als auch die mit pQE60-*cnx6/7* transformierte Mutante KB2047 waren negativ und besaßen Aktivitäten unter 2% der Wildtyp-Kontrolle. Von den dreifach mit *cnx5/6/7* komplementierten Mutanten lag die Aktivität der *moaD*-Mutante KB2047 bei 9% und die der *moeB*-Mutante MJ7*chN* bei 7% (Abb.2.15). Die im Overlay sichtbaren Aktivitätsunterschiede konnten damit bestätigt werden.

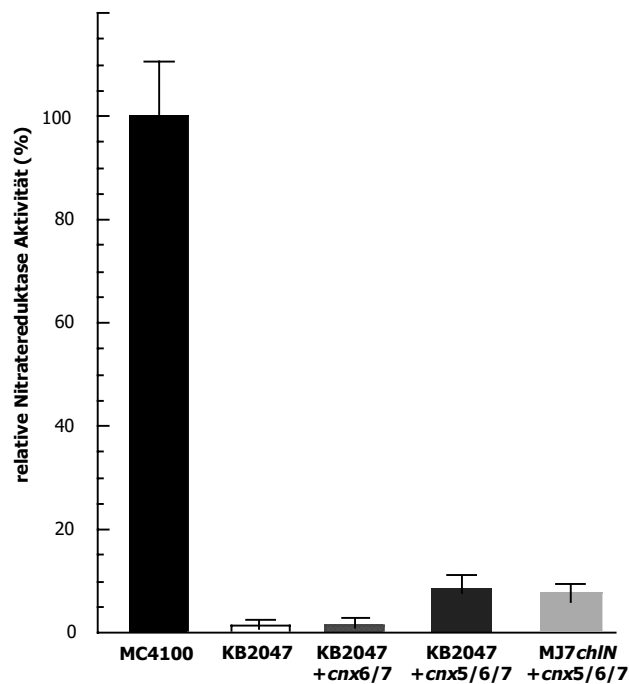


Abb. 2.15 Quantitative Bestimmung der Nitratreduktase Aktivität komplementierter Mutanten

Die Aktivität des Wildtypstamms MC4100 von 1,3 µmol Nitrit / min und mg Protein wurde auf 100% gesetzt, KB2047 und KB2047 mit *cnx6/7* besaßen Aktivitäten von unter 2%. Die Aktivität der dreifach mit *cnx5/6/7* komplementierten Mutanten KB2047 und MJ7*chN* bei 9% bzw. 7%. Die Zellen wurden mit 0,5% KNO₃ induziert und anaerob ÜN bei 37°C angezogen, die Fehlerbalken ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

Zusätzlich zu der qualitativ und quantitativ gezeigten Enzymaktivität der Nitratreduktase sollte auch das Reaktionsprodukt der MPT-Synthase, das MPT, mittels FormA-Analyse an der HPLC nachgewiesen werden.

2.3.1.2 MPT-Messung komplementierter Mutanten

Nitrat-induzierte Zellen (0,5% KNO₃) wurden anaerob ÜN bei 37°C angezogen und MPT, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, aufgereinigt. Die Expression der Plasmid-codierten Gene wurde mittels IPTG-Zugabe induziert, eine Induktions-abhängige MPT-Synthese sollte exemplarisch gezeigt werden.

Als Positivkontrolle diente die *moaD*-Mutante KB2047, die mit ihrem gendefekt-homologen Wildtyp-Gen (pQE30-*moaD*) transformiert wurde. Die so gemessene Menge an FormA-dephospho (593,97 pmol/mg Gesamtprotein) wurde auf 100% festgesetzt. Die mit Kontrollplasmid transformierte Mutante KB2047 zeigte als Negativkontrolle eine Restmenge an MPT, die bei 1% lag, in der Mutante MJ7*chI*N war kein MPT nachweisbar. Ohne die Induktion durch IPTG erreichte die mit den drei pflanzlichen Genen transformierte Mutante KB2047 durch schwache Basal-Expression der drei Proteine MPT-Mengen von etwa 3%. Wurde derselbe Klon mit IPTG (1mM) angezogen, so waren MPT-Mengen von 21% meßbar. Hierbei traten allerdings relativ große Schwankungen der MPT-Menge auf, die in verschiedenen vermessenen Klonen zwischen 12 und 26% lagen (Abb.2.16), dennoch konnte die IPTG-abhängige MPT-Bildung gezeigt und damit ihre Abhängigkeit von der Expression der pflanzlichen Proteine belegt werden. Für die Mutante MJ7*chI*N ließ sich dieses Ergebnis nicht in vollem Maße reproduzieren. So war nach Expression der drei pflanzlichen Gene im Gegensatz zur nicht-transformierten Mutante MPT nachweisbar, die Menge lag jedoch ohne IPTG nur bei 2,6% und war auch mit IPTG nur unwesentlich auf 4,1% der Positivkontrolle zu steigern.

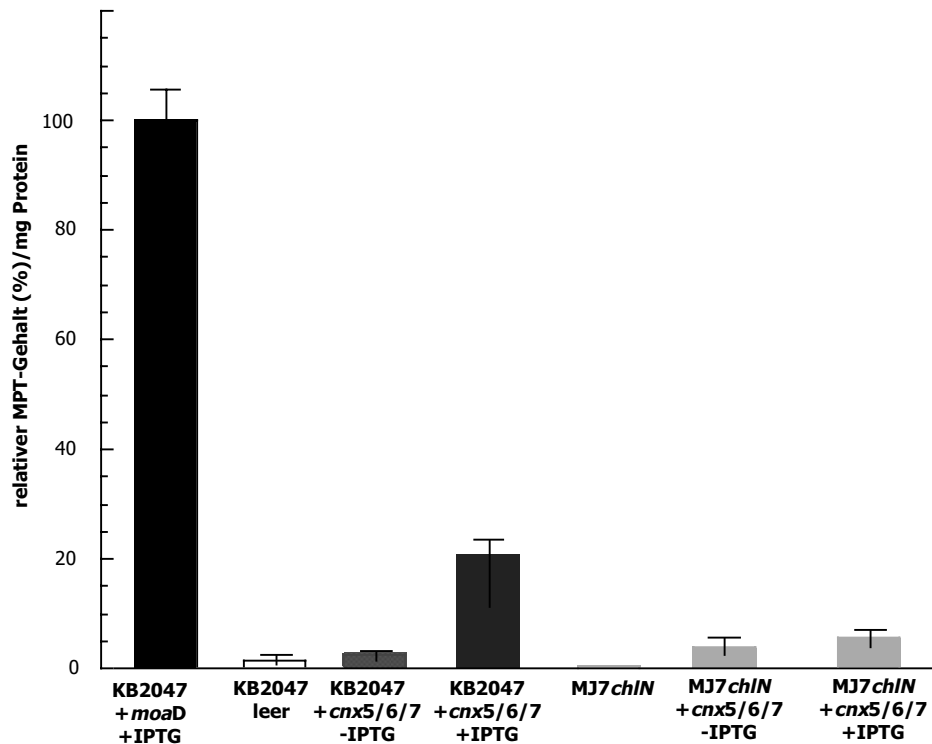


Abb. 2.16 MPT-Messung komplementierter Mutanten

Die Positivkontrolle (KB2047+ pQE30-*moaD*; 593,97 pmol/mg Gesamtprotein) wurde auf 100% gesetzt. Je 50 ml ÜN-Kultur wurden anaerob bei 37°C angezogen, die Fehlerbalken stammen aus zwei unterschiedlichen Messungen, wobei je drei verschiedene Klone jeder Mutante analysiert wurden. Die IPTG-Konzentration der induzierten Klone lag bei 1 mM.

2.3.1.3 Reinigung überexprimierter pflanzlicher MPT-Synthase

Wie gezeigt, ist die bicistronisch in *E.coli* exprimierte pflanzliche MPT-Synthase ohne zusätzliche *cnx5*-Expression nicht in der Lage, *moaD* Mutanten zu komplementieren. Vermutlich wird die pflanzliche kleine Untereinheit nicht durch die entsprechenden *E.coli* Komponenten aktiviert.

Die pflanzliche MPT-Synthase sollte in einem *E.coli* Expressionsstamm überexprimiert und aufgereinigt werden, um die Interaktion der heterolog exprimierten Proteine zu zeigen. Der Expressionsvektor pQE60-*cnx6/7* fusioniert einen aus sechs Histidinen bestehenden „His-Tag“ an den C-Terminus der großen Untereinheit Cnx6, die kleine Untereinheit wird nichtmodifiziert co-exprimiert. Nur wenn beide Proteine in *E.coli* miteinander interagieren, ist eine Co-Reinigung von Cnx7 über histidinbindende Ni-NTA Matrix möglich. Für die *E.coli* MPT-Synthase konnte gezeigt werden, daß eine

Komplexbildung der Untereinheiten unabhängig von einer Aktivierung der kleinen Untereinheit ist, demzufolge könnten auch die Untereinheiten der inaktiven pflanzlichen MPT-Synthase zusammen aufgereinigt werden. Cnx6/7 wurden im *E.coli*-Stamm M15 in 500 ml LB-Medium bei 37°C angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1mM IPTG induziert und die Expression für fünf Stunden fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. Dabei konnte eine Co-Reinigung der kleinen mit der großen Untereinheit der MPT-Synthase gezeigt werden (Abb. 2.17). Eine Sequenzierung der Proteine bestätigte die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine, wobei das molare Verhältnis etwa 1:1 betrug. Ein anschließender in vitro Aktivitätstest (*nit-1* Assay) des gereinigten Proteins war negativ.

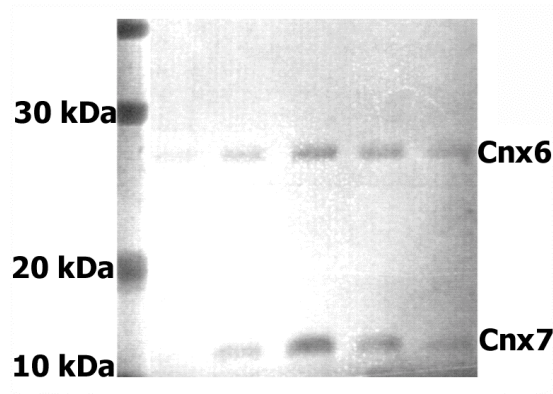


Abb. 2.17 Co-Reinigung pflanzlicher kleiner mit großer MPT-Synthase-Untereinheit nach heterologer Expression in *E.coli*

Die große Untereinheit Cnx6 (23,8 kDa) trägt einen His-Tag und konnte über Ni-NTA-Matrix aufgereinigt werden. Die kleine Untereinheit Cnx7 (10,5 kDa) wurde nach Co-Expression durch die Interaktion mit der großen Untereinheit Cnx6 co-gereinigt. Das Gel zeigt vier positive Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung.

2.3.2 *In vitro* Generierung aktivierter pflanzlicher MPT-Synthase

Da die in *E.coli* exprimierte pflanzliche MPT-Synthase inaktiv war bzw. sie auch bei Co-Expression von Cnx5 nur schwache Aktivitäten aufwies, sollte analog zur bakteriellen MPT-Synthase (2.1.1) die Aktivierung der kleinen Untereinheit *in vitro* durch Thiocarboxylierung nach Inteinabspaltung erfolgen.

2.3.2.1 Klonierung und Expression von *cnx7*

Die Nukleotidsequenz von *cnx7* wurde analog zu *E.coli moaD* über die durch PCR eingefügten Restriktionsstellen *NdeI* und *KpnI* in den Intein-Fusionsvektor pTYB2 kloniert. Das hergestellte Konstrukt wurde doppelsträngig sequenziert und zur Expression in den *E.coli* Stamm ER2566 transformiert.

Die Aufreinigung des Proteins (10,7 kDa) erfolgte gemäß Vorschrift. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde ÜN bei 4°C mit 50 mM DTT induziert, um das carboxylierte Protein zu erhalten, bzw. mit 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ um die thiocarboxylierte Form zu erhalten. Die Mengen der beiden aufgereinigten Cnx7-Varianten waren vergleichbar und sie verhielten sich im 15% igen Trycingel identisch (Abb. 2.18).

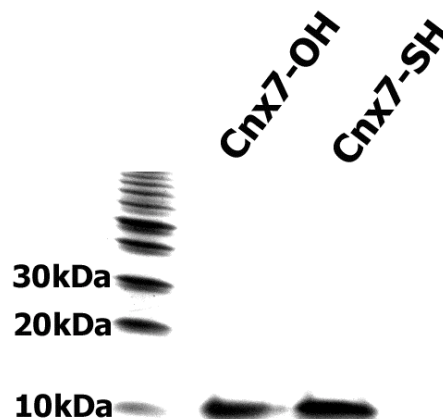


Abb. 2.18 SDS-Trycingel der aufgereinigten Cnx7-Proteine

Das Carboxylat (Cnx7-OH) und das Thiocarboxylat (Cnx7-SH) verhielten sich im Gel identisch (10,7 kDa). Die Konzentrationen lagen bei 0,83 mg/ml für Cnx7-OH und bei 0,64 mg/ml für Cnx7-SH.

2.3.2.2 Klonierung und Expression von *cnx6*

Die große Untereinheit der pflanzlichen MPT-Synthase (Cnx6) wurde in den Vektor pQE60 kloniert und mit C-terminalem His-Tag exprimiert. Acht Liter 2 x YT-Medium wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde ÜN bei RT angezogen, nach Standardprotokoll aufgearbeitet und das Protein an einer Chromatographie-Anlage (Gradi-Frac, Pharmacia) über eine 15 ml Ni-NTA-Säule gereinigt. Je 30 µl der Protein enthaltenden Elutionsfraktionen wurden im 15% igen SDS-Gel analysiert (Abb. 2.19).

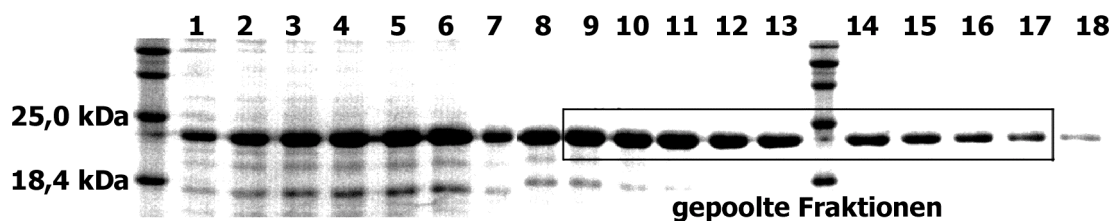


Abb. 2.19 Ni-NTA Aufreinigung von Cnx6.

Je 30 µl der Protein-enthaltenden Ni-NTA-Elutionsfraktionen Fraktionen wurden mittels 15% igem SDS-Gel nach Coomassie-Färbung analysiert. Die markierten Fraktionen 9 - 17 wurden gepoolt und konzentriert.

Mittels Westernanalyse (Daten nicht gezeigt) konnte bestätigt werden, daß Cnx6 mit einer berechneten Größe von 23,04 kDa in der SDS-Gelelektrophorese bei ca. 28 kDa läuft. Die Fraktionen 9-17 wurden anschließend gepoolt, zum Umpuffern ÜN dialysiert und auf 1,2 mg/ml ankonzentriert.

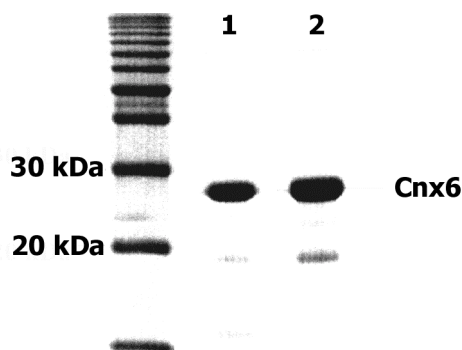


Abb. 2.20 Cnx6 Probe nach Ankonzentrierung

Neben Cnx6 ist noch eine leichte Abbaubande von ca. 19 kDa zu erkennen, die auch in allen weiteren Aufreinigungen vertreten war. Spur1 zeigt 5 µg, Spur2 10 µg Protein.

2.3.2.3 *In vitro* Assemblierung pflanzlicher MPT-Synthase

Mit gereinigtem Cnx6 sowie carboxyliertem und thiocarboxyliertem Cnx7 sollte die *in vitro* Assemblierung der pflanzlichen MPT-Synthase durchgeführt und mittels Gelfiltration an einer Superdex 200 Säule gezeigt werden. Die Arbeiten wurden analog zu den Untersuchungen der bakteriellen MPT-Synthase (2.1.3) durchgeführt. Bei Absorption von 280 nm konnten jedoch reproduzierbar die aufgetragenen Mengen an kleiner Untereinheit nicht detektiert werden. Die große Untereinheit war nur schwach und nicht ihrer Konzentration entsprechend nachzuweisen. Vergleicht man die berechneten Extinktionskoeffizienten mit denen der bakteriellen Proteine ($\text{MoaE}=37950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\text{MoaD}=5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), so sollte zumindest Cnx6 ($23710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) deutlich zu erkennen sein. Cnx7 weist einen sehr geringen Extinktionskoeffizienten auf ($1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), der die Schwierigkeiten in der Visualisierung durch den geringen Gehalt aromatischer Aminosäuren erklärt. Die Daten wurden mit dem ProtParam-Programm unter www.expasy.ch berechnet.

Da im Verlaufe der Arbeit mit dem Äkta-Chromatographie-System (Amersham Pharmacia) ein Gerät angeschafft wurde, das die Detektion dreier variabel einstellbarer Wellenlängen erlaubt, wurden die Versuche wiederholt und die Absorption bei 215 nm verfolgt. Hierbei wurden die Peptidbindungen der untersuchten Proteine sichtbar gemacht. Beide Untereinheiten konnten einzeln detektiert und ihre jeweilige Größe mittels kalibrierender Eichgerade der Superdex 200 ermittelt werden.

2.3.2.3.1 Gelfiltrations-Analyse von Cnx6, Cnx7 und assemblierter Komplexe

Wie im bakteriellen System verhielt sich auch die kleine pflanzliche Untereinheit monomerisch, die große pflanzliche Untereinheit lief im Gegensatz zu MoaE jedoch in der dimeren Form. Die rechnerische Größe der Cnx6-Elution lag bei 51,1 kDa (Kalibrierungsgerade: $y = 4E + 07e^{-0,4642x}$; $R^2 = 0,9995$). Da Cnx6 rechnerisch 23,04 kDa groß ist, kann davon ausgegangen werden, daß das Protein hier als Dimer vorlag. Eine solche Dimerisierung der großen Untereinheit konnte im bakteriellen System unter den verwendeten *in vitro* Bedingungen nur bei Zugabe der kleinen Untereinheit induziert werden.

Die Co-Inkubationen der beiden pflanzlichen Untereinheiten führte nicht zu der erwarteten Peakverschiebung (durch Komplexbildung). Obwohl *in vivo* bei Co-Expression der beiden Untereinheiten eine gemeinsame Co-Reinigung möglich war (2.3.1.3) und damit die Interaktion der heterolog exprimierten pflanzlichen Proteine gezeigt werden konnte, sind die verwendeten *in vitro* Bedingungen nicht geeignet, um eine Komplexbildung sicher zu belegen.

2.3.2.3.2 Komplexbildung einer chimären pflanzlich-bakteriellen MPT-Synthase

Eine Inkubation der großen pflanzlichen mit der kleinen bakteriellen Untereinheit führte hingegen zu einer leichten Peakverschiebung der großen Untereinheit, was auf eine Interaktion der beiden Proteine hindeutete. Die Komplementation von *E.coli moaE*-Mutanten durch Cnx6-Expression (2.3.1) war ein erster Beleg für diese chimerische Wechselwirkung und die Assemblierung einer heterotetrameren MPT-Synthase bestehend aus Cnx6 und MoaD. Da die Verschiebung aufgrund des bereits dimeren Cnx6 (im Gegensatz zu MoaE) nicht so deutlich war wie die bei der assemblierten homologen bakteriellen MPT-Synthase, wurden die Elutionsfraktionen in einer SDS-PAGE analysiert.

Es wurden von jedem Gelfiltrationslauf die 12 Fraktionen untersucht, die zwischen einem Elutionsvolumen von 13,0 ml – 14,4 ml lagen und damit rechnerisch einem Molekulargewichtsbereich von 50,01 kDa bis 95,78 kDa entsprachen. Je 30 µl der Fraktionen wurden mittels 15% tigen Trycingels aufgetrennt. Bei der Gelfiltration von Cnx6 allein sind in den Spuren 6-8 die stärksten Proteinbanden zu erkennen, kein Unterschied dazu trat bei Co-Inkubation mit Cnx7 auf (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu traten nach Gelfiltration der co-inkubierten Cnx6 und MoaD Proteine die Banden der Spuren 3-5 am deutlichsten hervor (Abb. 2-21). Die Peakverschiebung korrelierte der Größe nach mit einem Shift von ca. 20 kDa, die der Assoziation zweier kleiner bakterieller Untereinheiten an das Cnx6-Dimer entsprechen könnte.

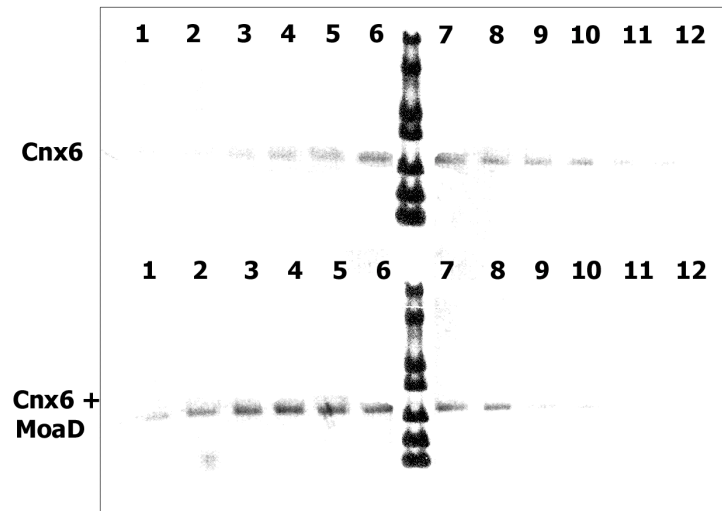


Abb. 2.21 Coomassie gefärbtes Trycingel der Gelfiltrations-Fractionen von Cnx6 und Cnx6+MoaD

Je 30 µl der FPLC-Fractionen 1-12 (Molekulargewichtsbereich von 50,01 kDa bis 95,78 kDa) von Cnx6 und Cnx6 co-inkubiert mit MoaD wurden mittels Trycin-Gelelektrophorese analysiert. Im oberen Gelbild sind die stärksten Banden in den Fractionen 6-8, im unteren Gelbild in den Fractionen 3-5 zu erkennen. MoaD war im Gel konzentrationsbedingt nicht eindeutig zu identifizieren, lediglich eine sehr schwache Bande der entsprechenden Größe war während der Gelentfärbung sichtbar.

2.3.2.3 Aktivitätsbestimmung der pflanzlichen MPT-Synthase und pflanzlich-bakterieller MPT-Synthase Chimären

Nachdem eine Komplexbildung pflanzlicher MPT-Synthase *in vitro* nicht gezeigt werden konnte, wohl aber eine chimärische Interaktion zwischen Cnx6 und MoaD erfolgte, sollten MPT-Synthase-Aktivitäten im *nit-1*-Rekonstitutions-Assay in allen Kombinationen der bakteriellen und pflanzlichen Untereinheiten gemessen werden. Als Kontrolle diente hierbei die homologe bakterielle MPT-Synthase in ihrer aktiven Form mit thiocarboxylierter kleiner Untereinheit (2.1.4). Um die gemessenen Aktivitäten zueinander in Relation setzen zu können, wurde die *nit-1* Aktivität im linearen Bereich der jeweiligen Reaktion auf die entsprechende Proteinkonzentration bezogen. Die assemblierte *E.coli* MPT-Synthase bildete unter den verwendeten Bedingungen das aktivste Enzym, im Vergleich dazu erreichte die homologe pflanzliche MPT-Synthase in ihrer hypothetisch aktiven thiocarboxylierten Form lediglich Aktivitäten von ca. 4,2%. Für die inaktive Variante der pflanzlichen MPT-

Synthase mit carboxylierter kleiner Untereinheiten waren nur Hintergrund-Aktivitäten von 1,7% zu messen. Die pflanzlichen Untereinheiten lagen einzeln getestet ebenfalls im Bereich des Hintergrundes. Eine chimäre Form der MPT-Synthase mit großer bakterieller Untereinheit (MoaE) und thiocarboxylierter kleiner pflanzlicher Untereinheit (Cnx7-SH) war nicht aktiv, während die Kombination von pflanzlicher großer Untereinheit (Cnx6) und aktivierter bakterieller kleiner Untereinheit (MoaD-SH) etwa 50% der Aktivität des homologen bakteriellen Enzyms erreichte (Abb. 2.22). Von einer Funktionalität dieses Komplexes konnte ausgegangen werden, da bereits in den vorherige Versuchen die *in vivo* Komplementation der *moaE*-Mutanten durch *cnx6*-Expression und die chimäre Komplexbildung gezeigt wurden.

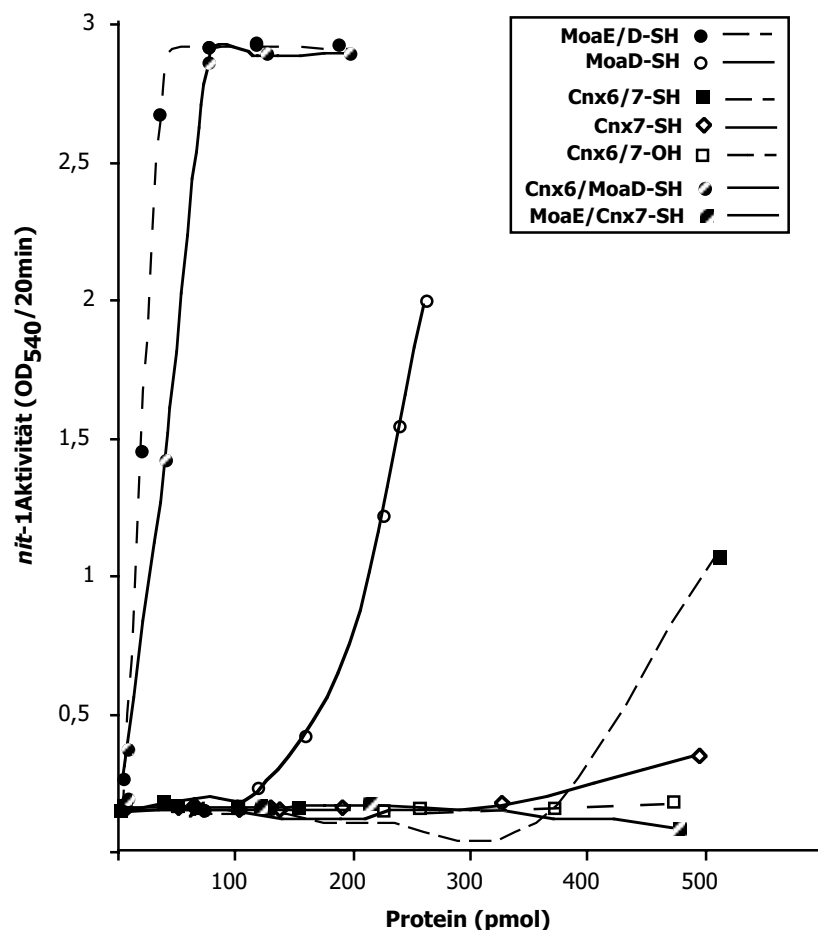


Abb. 2.22

MPT-Synthase Aktivität assemblierter pflanzlicher, bakterieller sowie chimärer MPT-Synthasen

Der Umsatz von PrecursorZ des *nit-1* Extraktes in MPT und die Rekonstitution der NR wurden über das entstehende Nitrit als roter Azofarbstoff bei OD₅₄₀ detektiert und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen.

2.4 Die humane MPT-Synthase

Die geringen pflanzlichen MPT-Synthase Aktivitäten sollten zum Vergleich zu einem weiteren eukaryontischen Enzym in Beziehung gesetzt werden. Dazu wurde die humane MPT-Synthase funktionell charakterisiert.

2.4.1 Klonierung und Expression von *mocs2A*

Die Nukleotidsequenz von *mocs2A* wurde analog zu *cnx7* und *moaD* über die mittels PCR eingefügten Restriktionsstellen *NdeI* und *KpnI* in den Intein-Fusionsvektor pTYB2 kloniert. Das hergestellte Konstrukt wurde doppelsträngig sequenziert und zur Expression in den *E.coli* Stamm ER2566 transformiert.

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte gemäß Vorschrift. Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte ÜN bei 4°C und wurde mit 50 mM DTT induziert, um das carboxylierte Protein aufzureinigen, bzw. mit 50 mM (NH₄)₂S um die thiocarboxylierte Form zu erhalten. Die Mengen der beiden aufgereinigten MOCS2A-Varianten waren vergleichbar, und beide verhielten sich im 15% tigen Trycingel identisch (Abb. 2.23).



Abb. 2.23 Trypsin gel der aufgereinigten MOCS2A-Proteine

Das Carboxylat (MOCS2A -OH) und das Thiocarboxylat (MOCS2A -SH) verhielten sich im Gel identisch (9,7 kDa) und waren in vergleichbaren Mengen aufzureinigen. Die Konzentrationen lagen bei 2,38 mg/ml für MOCS2A-OH und bei 2,28 mg/ml für MOCS2A-SH.

2.4.2 Klonierung und Expression von *mocs2B*

Die große Untereinheit der humanen MPT-Synthase lag in zwei verschiedenen Expressions-Systemen vor. Zum einen im pQE60 Vektor mit C-terminalem „His-Tag“ (pQE60*mocs2B*; Stallmeyer, 1998) und zum anderen nicht modifiziert in pET-15b (Leimkühler, unveröffentlichtes Ergebnis). Da die pQE60-Aufreinigung reproduzierbar kein überexprimiertes Protein brachte (Daten nicht gezeigt), wurde auf das pET-System zurückgegriffen.

Nach Ammonium-Sulfat-Fällung (30%) bei 4°C wurde das Pellet resuspendiert und ÜN dialysiert. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration an einer Superdex 200 Säule, bei der MOCS2B (20,94 kDa) bei 15,17 ml detektiert werden konnte, dieses Elutionsvolumen entspricht rechnerisch einem Molekulargewicht von 35 kDa, (Daten nicht gezeigt). Hierbei könnte es sich wie bei Cnx6 um eine dimere Form handeln. Die Proteinkonzentration des gelfiltrierten MOCS2B lag bei 0,94 mg/ml (Abb. 2.24).

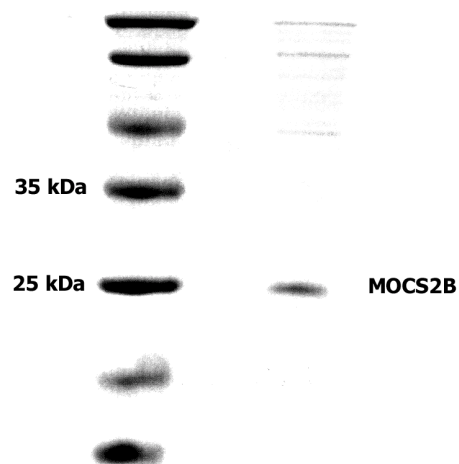


Abb. 2.24 MOCS2B im 15%tigen SDS-Gel

Die erzielte Proteinkonzentration war mit 0,94 mg/ml sehr gering, das Protein mit einer theoretischen Masse von 20,94 kDa läuft in der SDS-Gelelektrophorese bei ca. 24 kDa.

2.4.3 Komplementation von *moaE*-Mutanten durch *mocs2B* Expression

Eine Komplementation von *moaE*-Mutanten mit *mocs2B* konnte von Stallmeyer (1998) nicht gezeigt werden. Die Versuche wurden wiederholt, da eine Komplementation durch die Expression des eukaryontischen *cnx6* gezeigt werden konnte.

Durch *mocs2B*-Expression konnte die *moaE*-Mutante KB2050 reproduzierbar nicht komplementiert werden. (Abb. 2.25 zeigt einen zusammenfassenden Overlay der Komplementationsversuche durch heterologe Expression der großen humanen und pflanzlichen Untereinheiten). Die gleichen Ergebnisse konnten für die *moaE*-Mutante RK5204 erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

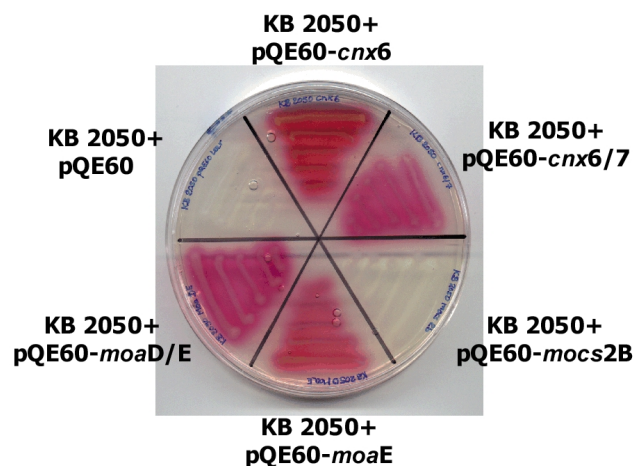


Abb. 2.25 Rekonstitutionsversuche der *E.coli moaE*-Mutante KB2050 durch Expression großer humaner und pflanzlicher Untereinheiten

Die mit pQE60-*cnx6*, -*cnx6/7*, -*mocs2b*, -*moaE*, -*moaD/E* und pQE60 transformierten KB2050 Mutanten wurden im quantitativen Nitratreduktase Overlay-Assay auf Rekonstitution getestet. Nur die mit *mocs2b* und pQE60-leer transformierten Mutanten zeigten keine wiederhergestellte Aktivität.

2.4.4 *In vitro* Assemblierung und *in vitro* MPT-Synthese humaner MPT-Synthase und human-bakterieller Chimären

Die MPT *in vitro* Synthese wurde im *nit-1*-System in allen Kombinationen der bakteriellen und humanen Untereinheiten untersucht. Als Kontrolle diente wiederum

die homologe bakterielle MPT-Synthase in ihrer aktiven Form (siehe 2.1.4). Zum Vergleich wurde die *nit-1* Aktivität im linearen Bereich der jeweiligen Reaktion auf die entsprechende Proteinkonzentration bezogen.

Im Vergleich zur *E. coli* MPT-Synthase lag die Aktivität der aktivierten humanen MPT-Synthase nur bei 1,4% (Abb. 2.26). Die chimäre MPT-Synthase aus bakterieller großer Untereinheit (MoaE) und thiocarboxylierter humaner kleiner Untereinheit (MOCS2A-SH) erreichte dagegen 12,2% der Aktivität des bakteriellen Enzyms. Alle anderen Messungen lagen im Bereich der Hintergrund-Aktivität. Damit ist im Falle der human-bakteriellen Chimäre die umgekehrte Kombination (große bakterielle, kleine humane Untereinheit) aktiv wie beim pflanzlich-bakteriellen Komplex (große pflanzliche, kleine bakterielle Untereinheit).

Die beiden eukaryontischen Untereinheiten, die zusammen mit der jeweiligen bakteriellen Komponente in den Chimären aktiv waren, wurden zu einem Komplex assembliert und ihre MPT Synthese Aktivität *in vitro* im *nit-1* Assay untersucht. Die kleine thiocarboxylierte humane Untereinheit und die große pflanzliche Untereinheit erreichen dabei Aktivitäten von 31,0% im Vergleich zum bakteriellen Enzym (Abb.2.26). Damit konnte erstmals deutliche Aktivität eines rein eukaryontischen MPT-Synthase-Komplexes gezeigt werden, auch wenn die beiden Untereinheiten aus unterschiedlichen Organismen stammen.

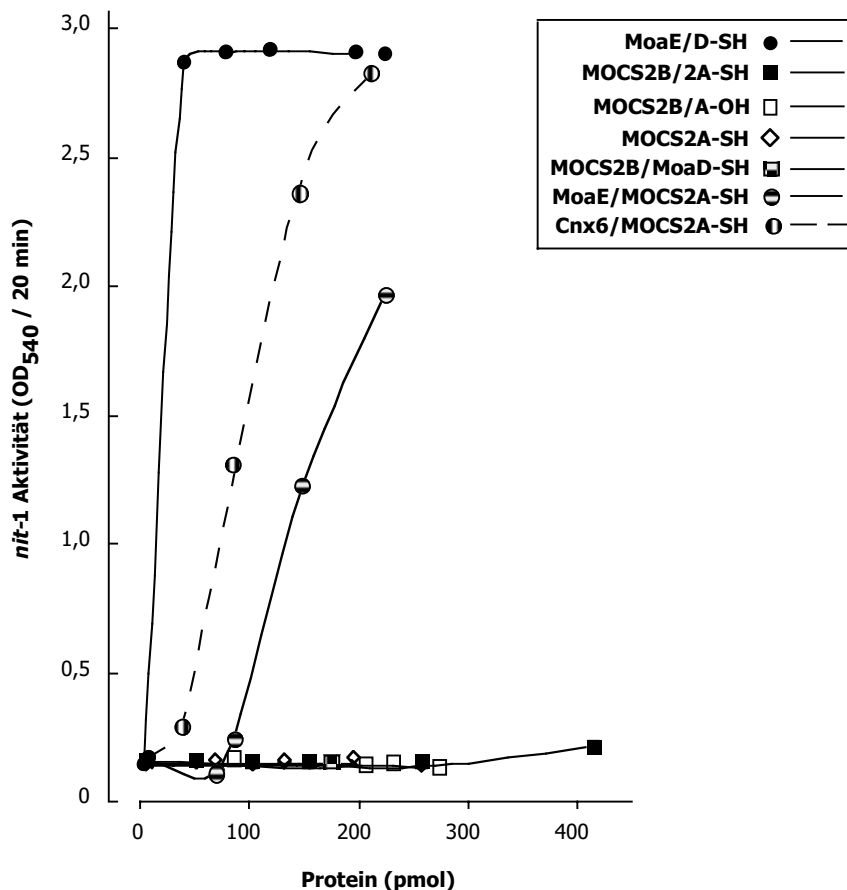


Abb. 2.26 *In vitro* MPT-Synthese Aktivität assemblierter humaner und bakterieller MPT-Synthase sowie chimärer Proteine

Im *nit-1* Assay wurden die humanen, bakteriellen und chimärische MPT-Synthasen sowie die einzelnen Untereinheiten auf MPT-Synthese getestet. Das entstehende Nitrit als Reaktionsprodukt der rekonstituierten Nitratreduktase wurde über einen gebildeten roten Azofarbstoff bei OD₅₄₀ detektiert und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen.

2.5 Aktivitätsvergleich der untersuchten MPT-Synthasen

Zur Übersicht sind in Abb. 2.27 alle gemessenen Aktivitäten im vergleichenden Balkendiagramm gezeigt. Die bakterielle MPT-Synthase ist das aktivste Enzym, 50% davon erreicht die bakteriell-pflanzliche Chimäre aus Cnx6 und thiocarboxyliertem MoaD, 31,0% die Chimäre aus kleiner thiocarboxylierter humaner Untereinheit und großer pflanzlicher Untereinheit, 12,8% die chimäre MPT-Synthase aus bakterieller großer Untereinheit (MoaE) und thiocarboxylierter humaner kleiner Untereinheit (MOCS2A-SH). Thiocarboxyliertes MoaD allein erreicht 10,47%, alle anderen Proteine hatten Aktivitäten unter 10%. Werte unter 1% sind im Bereich der Hintergrundaktivität.

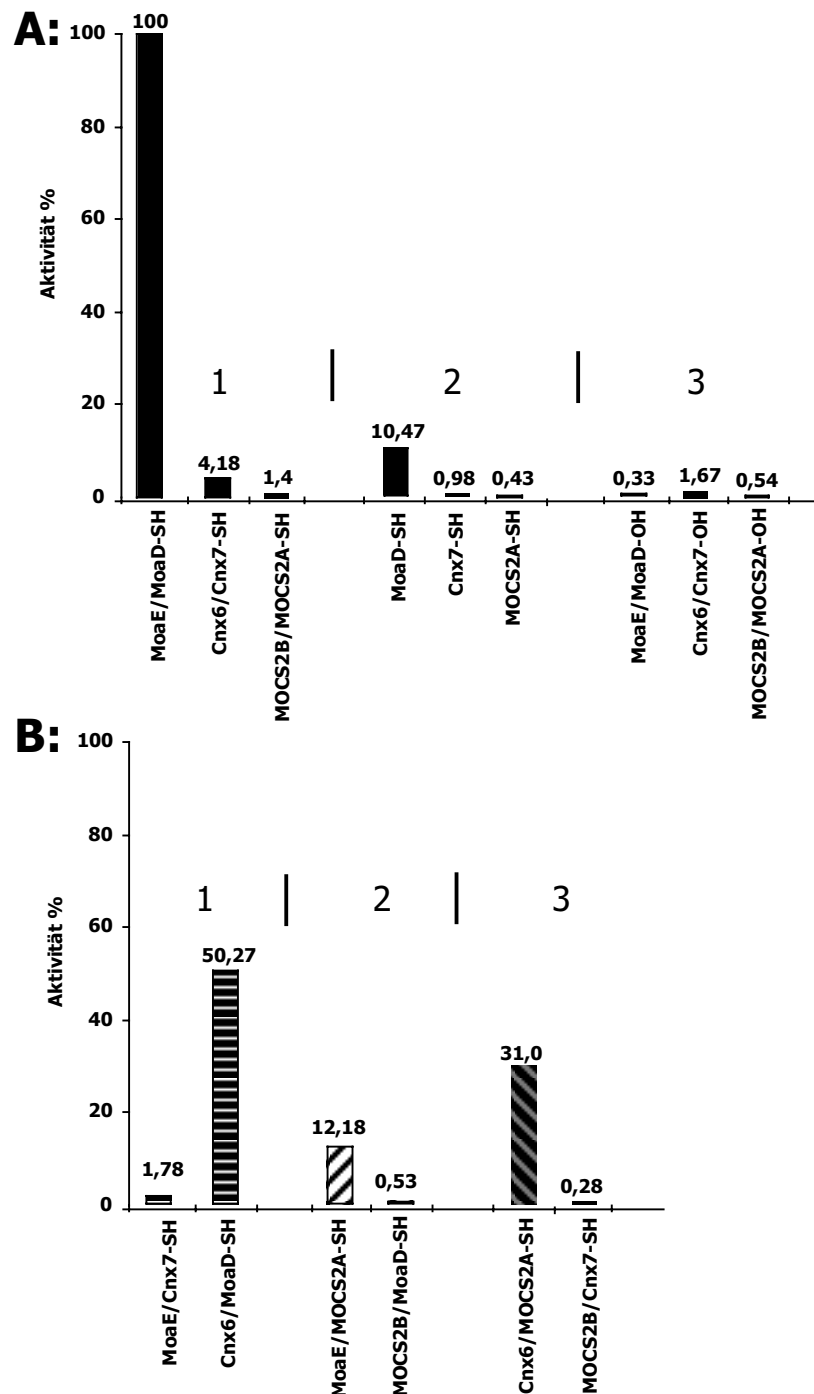


Abb. 2.27 Vergleichende Balkendiagramme der MPT-Synthase-Aktivitäten

A1 zeigt die Aktivitäten der homologen thiocarboxylierten MPT-Synthasen, A2 die thiocarboxylierten kleinen Untereinheiten allein, A3 die homologen carboxylierten MPT-Synthasen. B1 zeigt die pflanzlich-bakteriellen MPT-Synthase-Chimären jeweils in ihrer thiocarboxylierten Form, B2 die entsprechenden human-bakteriellen Chimären und B3 die pflanzlich-humanen MPT-Synthase-Chimären (alle Werte in Bezug zur auf 100% gesetzten homologen *E.coli* MPT-Synthase)

2.6 Identifizierung von Mutanten des zweiten Moco-Biosyntheseschritts

Im letzten Teil der Arbeit sollten eukaryontische Mutanten identifiziert werden, die einen Defekt im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese aufweisen. Dazu wurden sowohl *Arabidopsis thaliana* als auch *Neurospora crassa* Mutanten untersucht.

2.6.1 Chloratresistente Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Die Nitratreduktase (NR) reduziert Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-). Neben Nitrat reduziert die NR auch Chlorat zu toxischem Chlorit. Chloratresistente-Mutanten besitzen direkt oder indirekt einen Nitratreduktasedefekt, was zur namensgebenden Resistenz führt. In diesen Pflanzen können das Apoprotein der NR, der Kofaktor oder der Nitrat-Transport von der Mutation betroffen sein. Durch Mutagenese (Braaksma und Feenstra 1973 und 1982; Crawford 1992) wurden insgesamt sieben verschiedene Chlorat-Mutanten in *A.thaliana* generiert (Tab. 2.5 A). Von den sieben charakterisierten Mutanten war lediglich *chl5* noch keinem Gen zugeordnet.

Tab. 2.5 Pflanzliche chloratresistente Mutanten (A) und Lokalisation der Moco-Gene (B)

A:

Locus	Position	betroffenes Gen
<i>chl 1</i>	Chromosom I Position 24,5 cM	Nitrattransporter
<i>chl 2</i>	Chromosom II Position 45,2 cM	<i>cnx2</i>
<i>chl 3</i>	Chromosom I Position 67,5 cM	<i>nia2</i>
<i>chl 4</i>	Chromosom I Position 9,9 cM	<i>cnx3</i>
<i>chl 5</i>	Chromosom II Position nicht gemappt	Moco-Biosynthese
<i>chl 6</i>	Chromosom V Position 22 cM	<i>cnx1</i>
<i>chl 7</i>		γ -Adaptin

B:

Gen	Position
<i>cnx1</i>	Chromosom V. Position 22cM
<i>cnx2</i>	Chromosom II. Position 45,2cM
<i>cnx3</i>	Chromosom I. Position 9,9cM
<i>cnx4</i>	Chromosom I.
<i>cnx5</i>	Chromosom V. Position zw. 110,2cM und 115,7cM
<i>cnx6</i>	Chromosom II. Position 79cM
<i>cnx7</i>	Chromosom IV. Position zw. 29,6cM und 31,4cM

Die Mutation von *chl5* wurde auf Chromosom II gemappt. Da hier auch *cnx6* als Moco-Gen des zweiten Schritts lokalisiert ist (Tab. 2.5 B), sollte *cnx6* aus der Mutante isoliert und sequenziert werden. Für Cnx5 und Cnx7 existiert bisher kein korrespondierender Mutanten-Locus.

2.6.1.1 Klonierung von *cnx6* aus *A.thaliana chl5* und Sequenzvergleich mit dem Wildtyp

Aus Blättern von *chl5*- Pflanzen und dem zugehörigen Wildtyp (*Landsberg erecta*) wurde genomische DNA isoliert. Mittels PCR (25 Zyklen, 56°C-Annealing-Temperatur) konnte das intronfreie *cnx6* (594 bp) aus der genomischen DNA amplifiziert und in pGEM-Teasy kloniert werden. Je vier Klone wurden sequenziert und anschließend miteinander verglichen. Dabei wies die Mutante in allen Fällen eine Punktmutation von Cytosin zu Thymin an der Nukleotid-Position 264 auf. Durch diese Punktmutation an der ersten Stelle eines kodierenden Triplets kommt es an Aminosäure-Position 89 des Cnx6-Proteins der *chl5*-Mutante zu einem Austausch von Leucin zu Phenylalanin (Abb. 2.28).

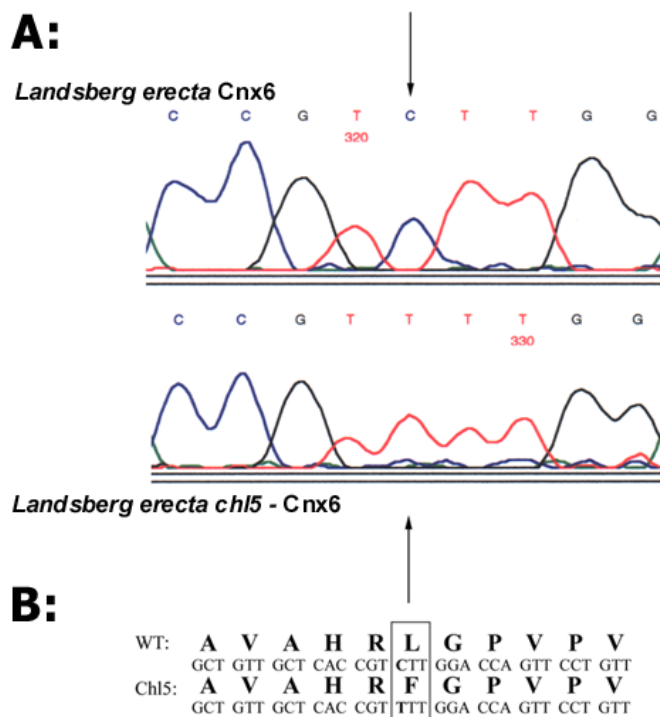


Abb. 2.28 Cnx6-Sequenzvergleich zwischen Wildtyp und *chl5*-Mutante

Der Sequenzvergleich (A) zeigt eine Punktmutation an der Nukleotid-Position 264, dabei wird ein Cytosin gegen ein Thymin ausgetauscht. Somit kommt es in der Aminosäuresequenz (B) zu einem Austausch von Leucin zu Phenylalanin.

Das Aminosäure-Alignment großer Untereinheiten (Abb. 2.29) zeigt, daß die Mutation an Position 89 in einer konservierten Region der Sequenz liegt. Die Mutation wird von einem invarianten Histidin (Position 87) und einem invarianten Glycin (Position 90) flankiert. Alle eukaryontischen Sequenzen besitzen an der Position 89 ein Leucin. In *E.coli* und *Bacillus subtilis* liegt an dieser Position mit Isoleucin eine dem Leucin strukturell ähnliche Aminosäure, lediglich die archaebakterielle Sequenz besitzt an dieser Stelle mit Arginin eine basische Aminosäure

		.10	.20	.30	.40	.50	.60	.70	.80	.90	.100	
Cnx6 Arabidopsis	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	29
Mocs2B_H_sapiens	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	65
Mocs2B_M_musculus	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	65
CnxH Aspergillus	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	63
MoaE Escherichia	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	25
MoaE Bacillus	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	22
MoaE Archaeoglobus	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	100
consensus	1:	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	100
		.110	.120	.130	.140	.150	.160	.170	.180	.190	.200	
Cnx6 Arabidopsis	29:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	110
Mocs2B_H_sapiens	65:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	146
Mocs2B_M_musculus	65:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	146
CnxH Aspergillus	63:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	144
MoaE Escherichia	25:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	106
MoaE Bacillus	22:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	103
MoaE Archaeoglobus	101:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	200
consensus	101:	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	QAG	200
		.210	.220	.230	.240	.250	.260	.270	.280	.290	.300	
Cnx6 Arabidopsis	111:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	198
Mocs2B_H_sapiens	147:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	188
Mocs2B_M_musculus	147:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	170
CnxH Aspergillus	145:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	195
MoaE Escherichia	107:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	150
MoaE Bacillus	104:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	157
MoaE Archaeoglobus	201:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	239
consensus	201:	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	GLD	289

Abb. 2.29 Cnx6-Mutation im Aminosäure-Alignment

Die konservierten Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau; die Position der Mutation der *ch15*-Mutante ist durch ein ! gekennzeichnet (Organismen siehe Abkürzungsverzeichnis).

2.6.1.2 Phänotypvergleich der *ch15*-Mutante und des Wildtyps

Pflanzensamen des Wildtyps und der Mutante wurden unter den gleichen Bedingungen ausgesät (Inkubationsschrank Percival, Tagestemperatur 22°C, Nachttemperatur 18°C, Luftfeuchtigkeit 70%). Ein Unterschied im Phänotyp wurde erst sichtbar, nachdem die Pflanzen durch Ausfall der Befeuchtung und kurzfristiger Temperaturerhöhung auf 35°C für 24 h gestreßt wurden. Die Pflanzen in Abb.2.30 sind 20 Tage alt. Die Blätter des Wildtyps zeigen normale Größe, Form und Farbe.



Abb. 2.30 **Phänotypen von *A. thaliana* (Ökotyp *L. erecta*) Wildtyp im Vergleich zur *chl5* Mutante**

Im Vergleich zum Wildtyp (links) zeigt die Mutante (rechts) nach Streßinduktion einen deutlichen Phänotyp.

Die *chl5*-Mutante hat im Vergleich zum Wildtyp kleinere, an den Rändern eingerollte Blätter und eine 5-Tage frühere Blühinduktion mit kleinen kurzstieligen Blüten.

2.6.2 Moco-Biosynthese in *Neurospora crassa*

Die *N.crassa nit*-Mutanten können nicht auf Nitrat als alleiniger N-Quelle wachsen, da sie eine Mutation im Apoenzym der Nitratreduktase oder der Molybdäcofaktor-Biosynthese aufweisen. Zwei dieser Mutanten (*nit-1* und *nit-8*) akkumulieren dabei PrecursorZ (Heck, 1995), und es ist keine MPT-Synthase-Aktivität nachweisbar. Da Tomsett und Garret (1980) bei der Klassifizierung der Mutanten bei gemeinsamer Kultur von *nit-1* und *nit-8* normales Wachstum auf festem Nitratmedium fanden, wurde davon ausgegangen, daß verschiedene Gene des zweiten Schritts der Biosynthese betroffen sind. Die *N.crassa* Wildtyp-Gene des zweiten Schritts (die kleine und große Untereinheit der MPT-Synthase sowie das MoeB homologe Protein) sollten mittels Datenbank-Analyse identifiziert und aus den Mutanten isoliert und sequenziert werden.

2.6.2.1 Die *Neurospora crassa* Wildtyp-Proteine des zweiten Schrittes

Eine BLAST-Suche der *N.crassa* Datenbank des Whitehead Instituts (USA) mit *cnxH*, *cnxG* und *cnxF* aus *Aspergillus nidulans* als Suchsequenzen identifizierte die Sequenz der kleinen Untereinheit der MPT-Synthase auf „contig 1.579“ mit 54 % Identität zu *Aspergillus nidulans cnxG*, die große Untereinheit lag auf „contig 1.12“ mit 26 % Identität zu *cnxH* und die Sequenz des *moeB* homologen Gens konnte auf „contig 2.21“ mit 54 % Identität zu *Aspergillus nidulans cnxF* gefunden werden.

2.6.2.1.1 Sequenz der kleinen MPT-Synthase Untereinheit

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die Sequenz der kleinen Untereinheit in *Neurospora crassa* über 300 bp. Die intronfreie Sequenz kodiert für ein Protein von 99 Aminosäuren. Auffällig ist das C-terminale Motiv, das bei den beiden Pilze *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* anstelle des sonst konservierten terminalen Doppelglycins ein terminales Serin-Glycin Motiv aufweist. Neben dem konservierten C-Terminus, der wie die *E.coli* Struktur zeigt, fingerartig in die große Untereinheit hineinragt (Rudolph *et al.*, 2001), ist ein N-terminaler Bereich des Proteins konserviert, dem strukturelle Funktion zuzuordnen ist. Hier weist die *N.crassa* Sequenz keine Besonderheiten auf.

```

      .10 .20 .30 .40 .50 .60 .70 .80
N.crassa 1:.....MSAPKPPKGFHNIILYFATASSH..TGKDM.EALPAP...LPLRKLFDTEERYQ..GIREAVLDHSLVTINLG:65
H.influenza 1:.....MNNVLFPAQTREL..IGVDA.IQLEDD..FATAEAVREHHAQKGDKWALALEK.GKLLVAINQT:58
Rhodobacter 1:.....MIDLLYFAWVRERD.RAARA.XRLETE..AATVAELVEERAREERYDLAFADLSSLRVADQE:59
H.sapiens 1:.....MVP....LCQVEVLYFAKSAEI..TGVR.S.ETISVP.QEIKALQLWKEIETRHP..GLAD.VRNQVIFAVRQE:62
M.musculus 1:.....MVP....RCQHDVLYFAKSAEI..AGVRS.ETISVP.QEIKASELWKEIETSLHP..GLAD.VRNQVIFAVRQE:62
A.nidulans 1:.....MST.....FQIHVFASASTY..TGRNT.ESLPAP...LPLSSCFDTLEAKYP..GKKEKVLSSCSISGDE:58
C.elegans 1:.....MIS.....IKVLFGEACQL..VGKRE.EAIDFP.EETDYEIRKTIENYP..AQK.IEKVMMLAVDQE:59
A.thaliana 1:MDKEVTKIESDDTSVETIKVLFARAREL..TGVPD.LTKMP.SGSTTQKCLDELVLKFP..SLEE.VRSCVVLAVNEE:73
Synechocystis 1:.....MAK.....SKLRVFASLQEQ..AKVAE.ESLVTK..LNTYQELYDSLAKRHG.FNLSS...SQVKVAVNDE:58
Synechococcus 1:.....MTT.....TITLCFGLAALSPEGQPMPLDLPATAADLKVAIARACDLMPSALAQLLQKSAIGSETRI:67
E.coli 1:.....MKVLFPAQVREL..VGTD.A.TEVAAD..FPTVEALRQHMAAQSDRWALRLD.GKLLAAVINQT:58

      .90 .100 .110
N.crassa 66:YVDMPSSEDEDEDNVTVTQEGDEVAIIPPVSSG:99
H.influenza 59:LMPL.....ESAVKNGDEIAFFPPVTGC:81
Rhodobacter 60:LAEF.....DAPLEGVREVAFFPPMTGC:82
H.sapiens 63:YVEL.....G.DQLLVLPQGEIAVIPPISGC:88
M.musculus 63:YVEL.....G.DQLLVLPQGEIAVIPPISGC:88
A.nidulans 59:YVDLVSDGEKSGNEGL.LIQGGEVAIIPPVSSG:91
C.elegans 60:YANP.....G.DRFELVRFT.EIAVIPPLSG:84
A.thaliana 74:YTTD.....SAIVQHRDELAIIPPISGC:96
Synechocystis 59:FTTM.....ENILDQSTIVFIPPVAGC:81
Synechococcus 68:YIDS.....DLIPASLSHLALLPPVSG:90
E.coli 59:LVSF.....DHPITDGEVAFFPPVTGC:81

```

Abb. 2.31 Sequenz-Alignment kleiner Untereinheiten der MPT-Synthase

Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. (Organismen siehe Abkürzungsverzeichnis; Accession-Nummern: *N.crassa* nicht in der Datenbank, NC_000907 *Haemophilus influenzae*, AF128444 *Rhodobacter capsulatus*, AF117815 *Homo sapiens*, AF091872 *Mus musculus*, AF138284 *Aspergillus nidulans*, NM_065701 *Caenorhabditis elegans*, AF208343 *Arabidopsis thaliana*, NC_000911 *Synechocystis* sp. PCC 6803, X99625 *Synechococcus* sp., NC_000913 *Escherichia coli*)

2.6.2.1.2 Sequenz der großen MPT-Synthase Untereinheit

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die große Untereinheit der MPT-Synthase über 720 bp, der kodierende Bereich ist zwischen den Nukleotidpositionen 189 und 289 durch ein 99 bp großes Intron unterbrochen. Das resultierende Protein ist 206 Aminosäuren lang. Über den zentralen, zu *E.coli moaE* homologen Teil hinaus besitzt die *N.crassa* Sequenz eine N-terminale Extension von 30 und eine C-terminale Extension von 33 Aminosäuren.

	1020304050607080	
Neurospora	1:	..MATQ...QPTQTDNSAQAQP...PQTNPAKPTISEPG...IYVALTHDHLNYQSVDRVRSPERAGATVVFAGTTRN:	68
Aspergillus	1:	..MSARPEPQPGSERNAEPLPSHLDPTTYPRTLTTTHGPTSIPLHLELTYYTLSPPTALQHVSSPSSGANILFLGTRD:	78
HOMO	1:	MSSLEISSSCFSLKTLPLSPPLVEDSAFEPSSRKDMDEVEEKSKDVINFATAEKLSDVEVSQLVISPLCGAVSLFVGTRN:	80
M.MUSCULUS	1:	MSSLEISSSCFSPMLPSSRSQSVEDNASEPSGKDVDDVQEKPKDIIQPTAEKLSVGEVSQLVISPLCGAVSLFVGTRN:	80
CNX6 ARATH	1:	MS.....AEEK..NLIELEEGHKVDVKYIDYVSAQA	42
E.COLI	1:MAETKIIVGQPFPFSVGEYFPWLAERDE.DGAVVTEGKVRN:	40
HAE.INFL	1:MTDIQIAVQEQPFQDNNAVYQWLSEQHS.IGAVVTEGKVRD:	40
RHODO.SPH.	1:MRVLVQAEFFFGAEEAQTADGAAAGAGAVVTEGKVRD:	38
SYNECOCOCCUS	1:MRVLVQAEFFFGAEEAQTADGAAAGAGAVVTEGKVRD:	38
SYNECOCYSTES	1:MALALFDISDQFINTQPLISALQCDQA	39
	90100110120130140150160	
Neurospora	69:	NFNSLDPVQHLSYTSAPALRTMLTICRSILTHGKGIAMVHRLGVVPIGEEGLIIVSSPFRQAQWRAEAEFECKA:	148
Aspergillus	79:	TFDDRPVARSYTSAPALAKSLHKISSEAVEKKGGLNGVYIAHRLGEVPVGEASIVVAVGAGHRGEWRGAEMVLEEVKE:	158
HOMO	81:	NFEGKKVISLEYEALPMAENEVRKICSDIEQKWPVKHIAVPHRLGLVPVSEASTIIIVSSAHRAASLEAVSAIDTLKA:	160
M.MUSCULUS	81:	NFEGKKVISLEYEALPMAENEVRKICNDIEQKWPVKHIAVPHRLGLVPVSEASTIIIVSSAHRAASLEAVSAIDTLKA:	160
CNX6 ARATH	43:	MFEGKTVLELRYEAVVPMATRCLSICTTASTVDHKKIAVAHRLGPVPVGETSVIIIVSSVHRADGLDACKFIDELKA:	122
E.COLI	41:	HNLGDSVNALTLEHPPGATEKALAEIVDEANRWPGRVTVIHRIGELWPGDEIVFVGVTSAAHRSSEAFEGQFIMDYKKT:	120
HAE.INFL	41:	LNL.DEVSSLYLEHPPATEKALAEIVDAQVRWDIQRVSVIHRVGLLQTGDEIVLVGVSSAHRGDAYHANEFIMDYKKS:	119
RHODO.SPH.	39:	LSG..ALEAMEIEHPGATERATAAIAEEARQRWHIDALVIHRHGRGLGPSEPIIMMVATAAAHRAEFFAAEFIMDYKKS:	116
SYNECOCOCCUS	39:	LSG..ALEAMEIEHPGATERATAAIAEEARQRWHIDALVIHRHGRGLGPSEPIIMMVATAAAHRAEFFAAEFIMDYKKS:	116
SYNECOCYSTES	40:	HNDGKQVDSLEYQVREIAINEGFKITAEAKERYDHHQIAVHRSCHLIGETAVMVGTVASHQQAQFQGTQVVIDIKK:	119
	170180190200210220230240	
Neurospora	149:	KVEVWKREBFEGEGGGVVRANRDGAVGVKVDPRIGKGEVDEKEDGDSGNGGNDRKS.....	206
Aspergillus	159:	RVEVWKREBF.VDGGMEVRENRE.....RDGFGKLTKTKE..DSR.....	195
HOMO	161:	KVEIWKKEIY.EES.STKGNKECF.....WASNS.....	188
M.MUSCULUS	161:	KVEIWKKEIY.EESTSSKRNKECF.....WAAGD.....	189
CNX6 ARATH	123:	SVFIWKKEVY.TNG.EIKENSEFM.....EKKLELAEKRDSIVKKTVVEEHHRRGCCGSGVRVEEDEEHKIDITGDM:	192
E.COLI	121:	RAFFWKREBT.PEG.DRWVEARESD.....QQAARKW.....	150
HAE.INFL	120:	RAFFWKREBT.NQG.ERDIEARESD.....KEALEKW.....	149
RHODO.SPH.	117:	RAFFWKKEVT.AGG.ADVAAKAD.....EALGRW.....	146
SYNECOCOCCUS	117:	RAFFWKKEVT.AGG.ADVAAKAD.....EALGRW.....	146
SYNECOCYSTES	120:	RLFIWKKEHY.FDYFATVVCCHHGS.....	145
		
Neurospora	:	
Aspergillus	:	
HOMO	:	
M.MUSCULUS	:	
CNX6 ARATH	193:	KSSS:196	
E.COLI	:	
HAE.INFL	:	
RHODO.SPH.	:	
SYNECOCOCCUS	:	
SYNECOCYSTES	:	

Abb. 2.32 Aminosäure-Sequenz-Alignment großer Untereinheiten der MPT-Synthase

Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. (Organismen siehe Abkürzungsverzeichnis; Accession-Nummern: *N.crassa* nicht in der Datenbank, AAD39471 *Aspergillus nidulans*, AAD 14599 *Homo sapiens*, AAD14601 *Mus musculus*, CAB38428 *Arabidopsis thaliana*, P30749 *Escherichia coli*, NC_000907 *Haemophilus influenzae*, NC_000911 *Synechocystis sp.* PCC 6803, X99625 *Synechococcus sp.*)

2.6.2.1.3 Sequenz des MoeB homologen Proteins

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die Sequenz des MoeB Homologons vermutlich über 2316 bp. Aufgrund der geringen Konservierung der N-terminalen Extension ist der Translationsstart nicht eindeutig zu bestimmen. Der Beginn des Gens wurde so gewählt, dass die Sequenzlänge mit der des *A. nidulans*-Gens *cnxF* vergleichbar ist. Der kodierende Bereich ist durch zwei Introns unterbrochen (Position 156 bis 597 und 885 bis 990). Das Protein besitzt eine Größe von 590 Aminosäuren. Über den zentralen, zu *E.coli moeB* homologen Teil besitzt die *N.crassa* Sequenz eine N-terminale Extension von 126 und eine C-terminale Extension von 174 Aminosäuren.

Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. Die beiden pilzlichen Sequenzen haben eine auffällig lange N-terminale Extension (Organismen siehe Abkürzungsverzeichnis Accession-Nummern: *N.crassa* nicht in der Datenbank, AF055287 *Aspergillus nidulans*, NC_000917 *Archaeoglobus fulgidus*, AF102544 *Homo sapiens*, AE003621 *Drosophila melanogaster*, AE000185 *Escherichia coli*, AF124159 *Arabidopsis thaliana*)

2.6.3.2 Isolierung und Klonierung der drei Gene des zweiten Schritts aus *nit-1* und *nit-8* Mutanten

Aus jeweils 1,5 g Mycel wurde genomische DNA der Mutanten isoliert, die Ausbeute lag bei 3,0 µg/µl (*nit-1*) bzw. bei 0,31 µg/µl (*nit-8*). Für die PCR wurden jeweils 1 bzw. 5 µl der genomischen DNA eingesetzt (55°C Annealingtemperatur). Die Abb. 2.34 zeigt exemplarisch die PCR-Amplifikation aus *nit-8* genomischer DNA.

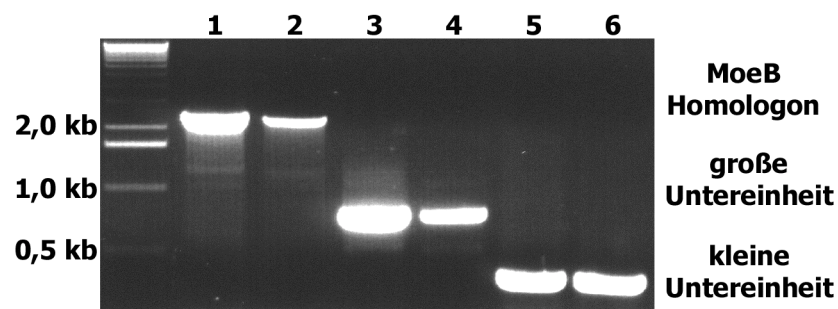


Abb. 2.34 PCR-Amplifikation der drei untersuchten Gene

In Spur 1 und 2 ist das Amplifikat des *moeB* homologen Gens, in Spur 3 und 4 das der großen Untereinheit und in Spur 5 und 6 das der kleinen Untereinheit gezeigt. In dem jeweils ersten Ansatz wurden 5 µl und im zweiten 1 µl DNA als Template eingesetzt.

Die PCR-Amplifikate wurden in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und positive Klone zur Sequenzierung eingesetzt. Die Abb. 2.35 zeigt exemplarisch die Klonierung der *nit-8* Fragmente der jeweiligen Gen-Sequenzen.

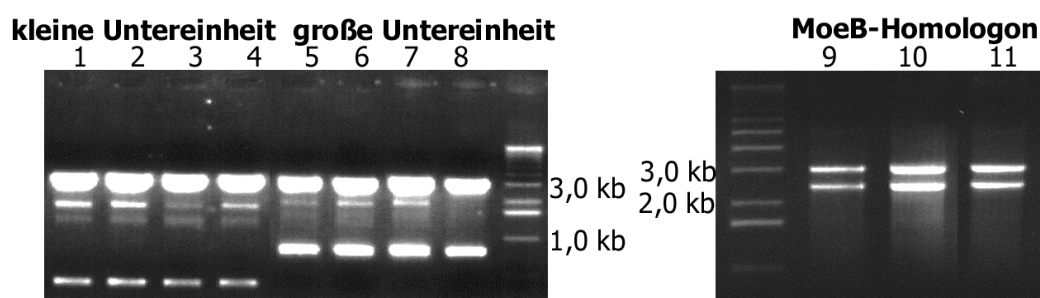


Abb. 2.35 Klonierung der PCR-Amplifikate in pGEM-T Easy

Die Amplifikate wurden durch einen NotI-Verdau aus dem Vektor geschnitten. Die Spuren 1 bis 4 zeigen die Fragmente der kleinen Untereinheit, die Spuren 5 bis 8 die der großen Untereinheit und die Spuren 9 bis 11 die des *moeB*-Homologen (linearisierter pGEM-T Easy hat eine Größe von 3,0 kb).

2.6.3.2.1 Sequenzanalyse der drei Gene des zweiten Schritts aus *nit-1* und *nit-8*

Mehrere Klone der amplifizierten Fragmente wurden doppelsträngig sequenziert und mit den zuvor ermittelten Wildtypsequenzen verglichen.

2.6.3.2.2 Identifizierung der *nit-1* Mutation

Alle sequenzierten Klone der beiden Untereinheiten der MPT-Synthase waren identisch zum identifizierten Wildtyp. Damit war von keiner Mutation innerhalb der MPT-Synthase auszugehen, sondern von einem Defekt in der S-Übertragung.

Fünf Klone des *moeB* homologen Gens aus zwei unabhängigen PCR-Reaktionen wurden sequenziert und mit der Sequenz der Datenbank bzw. aus *nit-8* verglichen. Dabei fand sich in jeder Sequenz an Nukleotidposition 477 eine Einbasenpaardeletion im ersten Intron. Diese Mutation im nicht translatierten Bereich des Gens läßt keine Rückschlüsse auf das exprimierte Protein zu. Deshalb wurden die Untersuchungen auf RNA-Ebene fortgesetzt. Es wurde RNA aus *nit-1* Mycel (KNO₃ induziert) isoliert. In drei unterschiedlichen Ansätzen wurden 100 µg, 150 µg und 200 µg gemörsertes Mycel eingesetzt. Die RNA-Konzentrationen lagen bei 2,12 µg/ml (Probe 1), 2,44 µg/ml (Probe 2) und 2,48 µg/ml (Probe 3).

Jede der drei RNA-Proben wurde für 60 min mit DNase inkubiert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Von der cDNA der drei verschiedenen RT-Reaktionen wurden jeweils 1 µl und 5 µl als Template eingesetzt und damit versucht, die drei zu untersuchenden Transkripte mit genspezifischen Primern zu amplifizieren. Wie in Abbildung 2.36 zu erkennen, konnten die kleine und große Untereinheit in allen Ansätzen amplifiziert werden, wohingegen kein Transkript des *moeB* Homologons nachzuweisen war.

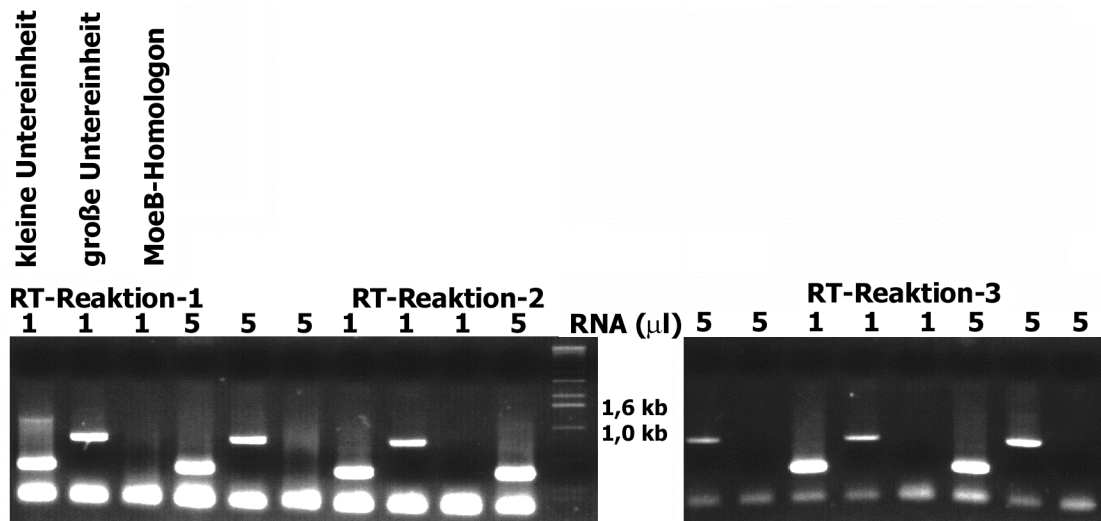


Abb. 2.36 PCR der RT-Reaktion

Die Spuren 1-6 zeigen die PCR-Produkte der RT-Reaktion 1. Dabei wurden in den ersten drei Spuren 1 µl Template und in den nächsten drei Spuren 5 µl eingesetzt. Analog dazu wurden die RT-Reaktionen 2 und 3 aufgetragen.

Da der Beginn des *moeB*-homologen Gens nicht eindeutig festgelegt werden konnte, wurden in einer weiteren PCR-Reaktion zusätzlich noch vier verschiedene geninterne 5'-Primer, die jeweils weiter im 3'-Bereich des Gens lagen (genaue Lage der Primer siehe Anhang), eingesetzt, um das *moeB* Homologon zu amplifizieren. Wie in Abb. 2.37 zu sehen, führt ein unmittelbar vor dem hypothetischen Startcodon gelegener Primer nicht zu einer Amplifikation. Von vier weiteren Ansätzen entstanden mit den drei am weitesten im 3'-Bereich des Gens gelegenen Primern Amplifikate (Ansätze B). Zur Kontrolle wurde in den Ansätzen A genomische DNA als Template eingesetzt. In allen Ansätzen mit genomischer DNA konnte ein Amplifikat erzeugt werden.

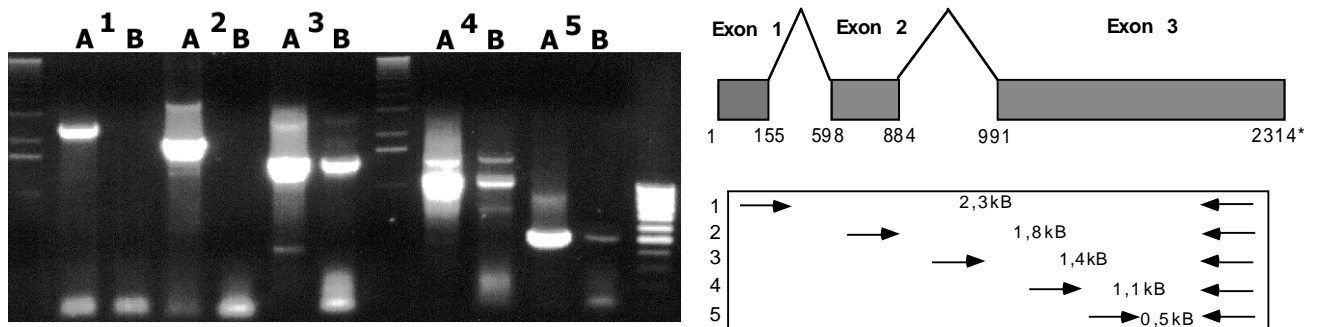


Abb. 2.37 PCR des *moeB*-Homologons mit verschiedenen 5' Primern

In Ansatz 1 wurde ein unmittelbar vor dem hypothetischen ATG gelegener Primer, in den Ansätzen 2-5 jeweils weiter 3'-gelegene 5' Primer verwendet. In den Ansätzen A wurde genomische DNA, in B cDNA als Template eingesetzt.

Im weiteren sollte festgestellt werden, ob es sich bei den erzielten Amplifikaten um cDNA-Amplifikate oder Amplifikate aus genomischer DNA-Verunreinigung handelt. Im Gel konnten keine Größenunterschiede festgestellt werden und nach Subklonierung und Sequenzierung enthielten die Amplifikate der großen Untereinheit der MPT-Synthase und des *moeB* Homologons Intron-Sequenzen und sind damit auf genomische DNA-Verunreinigungen zurückzuführen. So ist z.B. auch mit Primer 3 (Abb. 2.37) ein Amplifikat mit cDNA-Template zu erzielen, obwohl dieser in einer Intronsequenz bindet. Über die Transkription des potentiell von der Mutation betroffenen Gens ist damit keine eindeutige Aussage möglich.

2.6.3.2.3 Identifizierung der *nit-8* Mutation

Das *moeB* homologe Gen und die große Untereinheit entsprachen in allen sequenzierten Klonen dem Wildtyp. Von der kleinen Untereinheit wurden fünf Klone sequenziert. Dabei konnte eine Einbasenpaardeletion eines Thyminidins an Position 249 festgestellt werden (Abb. 2.38). Durch die Deletion tritt ein Frameshift auf, so daß ab der Aminosäureposition 83 der translatierte Leserahmen wechselt und die letzten 16 Aminosäuren des Wildtypproteins durch 29 neue Aminosäuren ersetzt werden. Das resultierende Protein hat eine Länge von 112 Aminosäuren. Der konservierte C-Terminus des Wildtypproteins wird dadurch nicht mehr translatiert (Abb. 2.39).

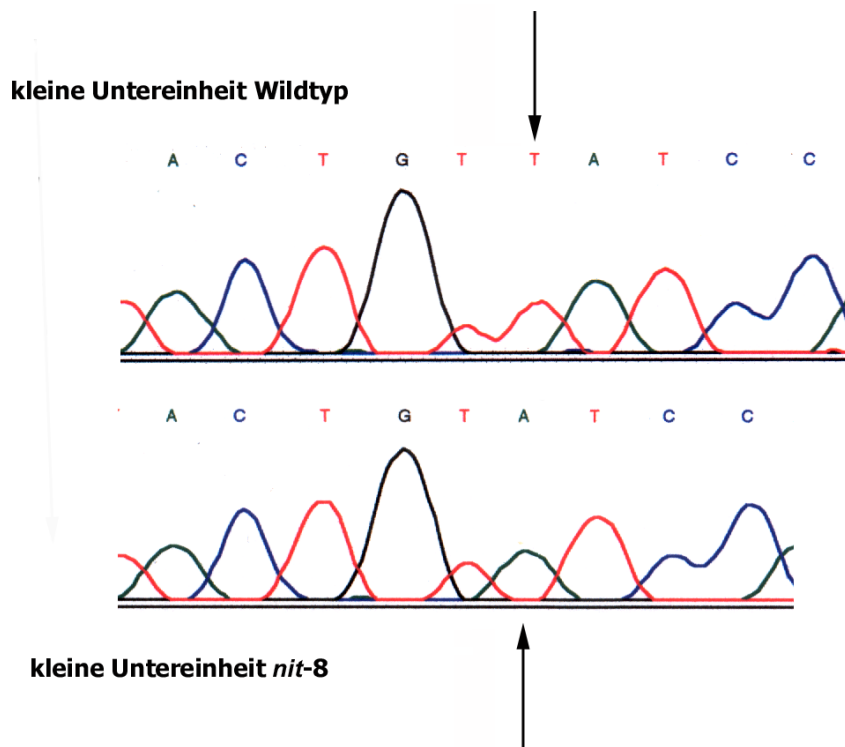


Abb. 2.38 Sequenzvergleich des Elektropherogramms der kleinen Untereinheiten von *N. crassa* WT und *nit-8*

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Nukleotidpositionen 244 bis 253 von Wildtyp und *nit-8* Sequenz. An Position 249 tritt eine Einbasenpaardeletion in *nit-8* auf (Pfeil).

Frame 3	E	R	A	E	T	P	K	G	S	F	Q	H	P	V	L	R	N	C
Frame 2	.	A	R	R	N	P	Q	R	V	I	S	T	S	C	T	S	Q	L
Frame 1	M	S	A	P	K	P	P	K	G	H	F	N	I	L	Y	F	A	T
	ATG	AGC	GCG	CCG	AAA	CCC	CCA	AAG	GGT	CAT	TTC	AAC	ATC	CTG	TAC	TTC	GCA	ACT
				9		18			27		36			45			54	
	.	L	P	H	R	Q	G	Y	G	S	T	T	G	A	A	T	L	A
	.	A	P	T	Q	A	R	I	W	K	H	Y	R	R	Y	P	C	G
	A	S	S	H	T	G	K	D	M	E	A	L	P	A	P	L	P	L
	GCT	AGC	TCC	CAC	ACA	GGC	AAG	GAT	ATG	GAA	GCA	CTA	CCG	GCG	CTA	CCC	TTG	CGG
				63		72			81		90			99			108	
	.	L	.	H	T	R	G	A	V	P	G	Y	S	R	S	G	A	.
	S	L	T	H	S	R	S	G	T	R	V	F	E	K	R	C	L	I
	L	F	D	T	L	E	E	R	Y	Q	G	I	R	E	A	V	L	D
	CTC	TTT	GAC	ACA	CTC	GAG	GAG	CGG	TAC	CAG	GGT	ATT	CGA	GAA	GCG	GTG	CTT	GAT
				123		132			141		150			159			168	
	G	H	D	K	L	G	L	R	G	Y	A	E	Q	.	G	.	R	R
	W	S	R	.	T	W	A	T	W	I	C	R	A	V	R	M	K	T
	L	V	T	I	N	L	G	Y	V	D	M	P	S	S	E	D	E	D
	CTG	GTC	ACG	ATA	AAC	TTG	GGC	TAC	GTG	GAT	ATG	CCG	AGC	AGT	GAG	GAT	GAA	GAC
				183		192			201		210			219			228	
	.	R	Y	C	I	Q	E	G	D	E	V	A	I	I	P	P	V	S
	I	T	L	L	Y	E	R	R	G	R	G	G	Y	H	T	S	G	Q
	D	N	V	T	V	S	K	K	G	T	R	W	L	S	Y	L	R	S
	GAT	AAC	GTT	ACT	CTA	TCC	AAG	AAG	GGG	ACG	AGG	TGG	CTA	TCA	TAC	CTC	CGG	TCA
				243		252			261		270			279			288	
	.	K	R	G	I	H	A	D	I	V	Y	Q	S	L				
	L	K	A	G	D	T	C	R	H	C	L	P	I	T				
	A	E	S	G	G	Y	M	Q	T	L	S	T	N	H	.			
	GCT	GAA	AGC	GGG	GGA	TAC	ATG	CAG	ACA	TTG	TCT	ACC	AAT	CAC	TAG			
				303		312			321		330			339				

Abb. 2.39 Sequenz mit Leserasterverschiebung der kleinen Untereinheit in *nit-8*

Die Position der Basenpaardeletion ist in der Nukleotidsequenz unterstrichen. Der codierende Leserahmen ist rot hervorgehoben, der Original-Frame ist ab der Punktmutation unterstrichen, zw. T und A fehlt das Nukleotid T.

3. Diskussion

3.1 Die bakterielle MPT-Synthase

Das Protein-Expressionssystem des IMPACT™ CN-Kits (New England Biolabs) lieferte den Schlüssel zur funktionellen Charakterisierung der MPT-Synthase. Die postulierte Aktivierung durch Schwefelübertragung auf den C-Terminus der kleinen Untereinheit (Pitterle und Rajagopalan, 1998) konnte in dieser Arbeit *in vitro* durch eine Modifizierung des Intein-Originalprotokolls (Kinsland, 1998) erzielt werden. Damit war es möglich, die kleine Untereinheit in nicht-modifizierter und potentiell aktivierter Form als C-terminales Thiocarboxylat hinsichtlich ihrer Komplexbildungseigenschaften mit der großen Untereinheit und resultierender Aktivität zu untersuchen.

3.1.1 Die MPT-Synthase ist ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten

In der ersten Charakterisierung (Pitterle *et al.*, 1993) wurde die MPT-Synthase als ein heterodimeres Enzym, bestehend aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, beschrieben.

Die getrennte Expression und Reinigung der beiden Untereinheiten MoaD und MoaE ermöglichte eine *in vitro* Assemblierung des MPT-Synthase Komplexes. Die Gelfiltrationsversuche (2.1.3) zeigten, daß beide Untereinheiten einzeln exprimiert *in vitro* monomerisch vorliegen, sie aber nach Co-Inkubation einen Komplex bilden. Dieser hat das Molekulargewicht eines Tetramers bestehend, aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der nativen Gelelektrophorese (2.1.6.1), so wird deutlich, daß erst die Anwesenheit der kleinen Untereinheit eine einheitliche Konformation der großen Untereinheiten induziert. *In vivo* könnte damit in Prokaryonten die Situation in der Hinsicht anders aussehen, als daß schon die gemeinsame Expression der im *moa*-Operon lokalisierten Gene (*moaD* und *moaE*) das freie Vorliegen der großen Untereinheit und damit die monomere Konformation unwahrscheinlich macht.

Die Affinität der Proteine zueinander war in den Gelfiltrationsversuchen so hoch, daß die gemeinsame Inkubation nur weniger Sekunden bis zur vollständigen Komplex-

bildung bedurfte. Dabei war der Aktivierungszustand der kleinen Untereinheit irrelevant, lediglich ein leichter Shift des Elutionsvolumens im Vergleich des thiocarboxylierten und carboxylierten Komplexes deutete auf einen konformellen Unterschied hin. Zumindest *in vivo* muß ein Affinitäts-Unterschied signifikant sein, da die kleine Untereinheit vor ihrer Interaktion mit der großen Untereinheit bzw. nach der Schwefelübertragung in der MPT-Synthase in einem Komplex mit MoeB adenyliert wird (Leimkühler *et al.*, 2001 und Lake *et al.*, 2002). Nachfolgend muß noch eine Schwefelübertragung auf MoaD erfolgen, bevor aktive MPT-Synthase gebildet werden kann. Der Zustand des C-Terminus der kleinen Untereinheit sollte demnach Auswirkungen auf die Affinitäten der beteiligten Proteine zueinander haben. Eventuell könnte nach einer Co-Inkubation der drei Proteine MoeB, MoaE und MoaD die Verteilung der kleinen Untereinheiten auf die beiden Komplexpartner in Abhängigkeit zur C-terminalen Gruppe gezeigt werden. Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten zwischen den Varianten der kleinen Untereinheit und MoeB bzw. MoaE sollte ebenfalls Unterschiede aufzeigen.

Parallel zu diesen Arbeiten erfolgt die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der *E.coli* MPT-Synthase (Rudolph *et al.*, 2001). Diese bestätigte die in der Gelfiltration gezeigte heterotetramere Form des Enzyms (Abb.3.1). MoaE dimerisiert über antiparallele β -Faltblätter und bildet so die Symmetrieachse des Tetramers. An den beiden entgegengesetzten Enden der großen Untereinheiten erfolgt jeweils die Interaktion mit der kleinen Untereinheit. MoaD weist Strukturelle Homologien zu Ubiquitin auf und die vier terminalen Aminosäuren des C-Terminus stecken fingerförmig in einer Tasche von MoaE. Unterschiede zwischen einem rein carboxylierten und einem rein thiocarboxylierten Komplex konnten nicht gezeigt werden, da die bicistronisch in *E.coli* exprimierte MPT-Synthase nur partiell aktiv vorlag und nicht auf eine *in vitro* Assemblierung zurückgegriffen wurde. Der hypothetische konformelle Unterschied der beiden Komplexe, den die Gelfiltration vermuten läßt, könnte durch die gezeigte Intein-Methodik im kristallographischen Ansatz belegt werden.

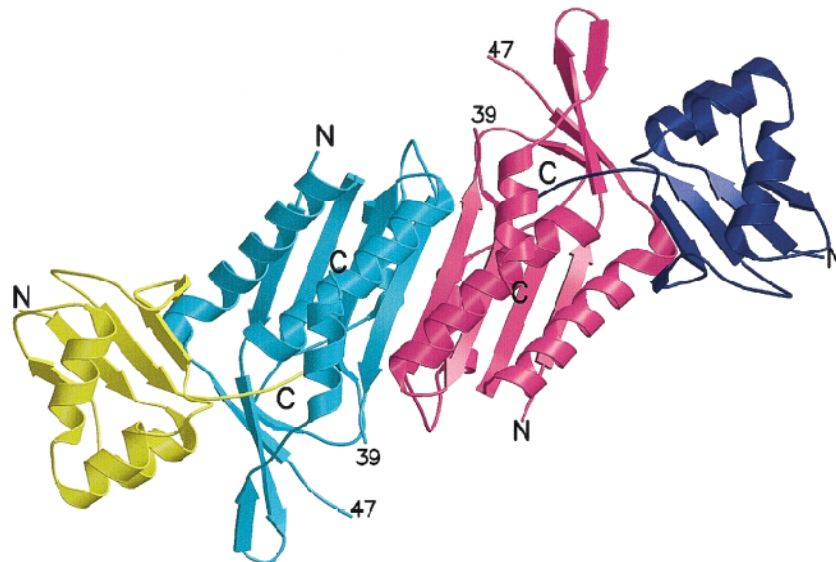


Abb. 3.1 Struktur der bakteriellen MPT-Synthase

Die MPT-Synthase Struktur wurde durch Rudolph *et al.* (2001) aufgeklärt. Die Abbildung zeigt α -Helices und β -Faltblätter in einem Ribbon-Diagramm. Mit N und C sind die jeweiligen Amino- und Carboxytermini der Proteine gekennzeichnet, zwischen den Aminosäurepositionen 39 und 47 der großen Untereinheiten ist die Struktur nicht eindeutig zu bestimmen gewesen. Die kleinen Untereinheiten (gelb/dunkelblau) interagieren an den entgegengesetzten Enden mit der jeweiligen großen Untereinheit (türkis/magenta).

3.1.2 Die kleine Untereinheit der MPT-Synthase liegt in aktiver Form thiocarboxyliert vor

Die nach der Gelfiltration vorgenommenen Aktivitätsmessungen zeigten eindeutig, daß für eine Aktivierung der kleinen Untereinheit eine C-terminale Thiocarboxylierung unabdingbar ist.

Der Unterschied der im *nit-1* Rekonstitutions-Assay ermittelten Aktivität der beiden Komplexe lag in einer Größenordnung von 10^3 . Damit konnte die lange postulierte Schwefel-aktivierte Form von Moad belegt und ihre Funktionalität gezeigt werden.

Die *in vitro* MPT-Synthase charakterisierte die im *nit-1* Assay gemessene alleinige Aktivität thiocarboxylierter kleiner Untereinheiten als versuchsbedingte Interaktion mit großer Untereinheit des *Neurospora crassa nit-1* Extraktes. Diese ist nicht durch die Mutation in *nit-1* betroffen (vgl. 2.7.2.3.1). Damit ergaben sich ersten Hinweise auf eine chimäre Komplexbildung und die MPT-Synthase-Rekonstitution durch Untereinheiten verschiedener Organismen. Nur wenn die thiocarboxylierte kleine

Untereinheit mit großer Untereinheit co-inkubiert vorlag, war eine MPT-Bildung aus aufgereinigtem PrecursorZ detektierbar (2.1.4). Deutlich wird diese Interpretation auch von den im MALDI vermessenen Reaktionsansätzen belegt (2.1.5). Die kleine Untereinheit kann nur dann ihren Carboxyl-Schwefel auf PrecursorZ übertragen, wenn gleichzeitig große Untereinheit vorhanden ist. Diese sollte für die richtige Positionierung des PrecursorZ verantwortlich sein, aber auch eine katalytische Beteiligung an der Reaktion kann nicht ausgeschlossen werden.

Eine alleinige Aktivität der kleinen Untereinheit schien bis zu diesen Versuchen nicht unmöglich zu sein, da alle zu MoaD homologen Proteine anderer Stoffwechselwege allein funktionell sind. So überträgt zum Beispiel das zu MoaD mit 40% homologe ThiS in der Thiaminbiosynthese Schwefel auf einen Thiazol-Precursor (Begley, 1999). Die große Untereinheit MoaE existiert nur in der Moco-Biosynthese und es gibt keine verwandten Proteine anderer Stoffwechselwege. Eine Schutzfunktion des oxidations-sensitiven PrecursorZ bei der Reaktion zu Molybdopterin wurde bisher angenommen. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine zwei-Schwefel-Übertragung mit damit verbundener Ringöffnung des cyclische Phosphats. Die Beteiligung von MoaE könnte nötig sein, da eine Anlagerung der kleinen Untereinheit an PrecursorZ über ihren terminalen Schwefel analog zu ThiS für die Konversion zu MPT nicht ausreichend sein könnte.

3.1.3 Funktionalität einer heterodimeren MPT-Synthase

Für die Reaktion eines Moleküls PrecursorZ zu Molybdopterin ist die Übertragung zweier Schwefelatome notwendig. Deshalb wäre eine Kooperation zweier aktiver Zentren nicht unwahrscheinlich, jedoch zeigt die Struktur der MPT-Synthase die räumliche Trennung der aktiven Zentren voneinander, was auf eine unabhängige Funktion der beiden Hälften des Tetramers hindeutet.

Mittels gerichteter Mutagenese sollten bestimmte Aminosäuren, die an der Dimerisierung durch ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, ausgetauscht werden. Für diese Experimente wurden die Koordinaten der MPT-Synthase Struktur vor Veröffentlichung durch H.Schindelin (Stony Brook, NewYork) zur Verfügung gestellt und die Aminosäurepositionen ausgesucht.

Mit einer der generierten Mutanten wurde dabei eine Größenverschiebung des assemblierten Komplexes in der Gelfiltration beobachtet, die einer dimeren MPT-Synthase entsprechen könnte. Diese Doppelmutante, bei der an Aminosäure-Position 37 ein Lysin und an Position 108 ein Phenylalanin gegen Alanin ausgetauscht wurde, war weiterhin in der Lage, MPT zu bilden und *moaE*-Mutanten zu komplementieren. In der nativen Gelelektrophorese (2.1.6.1) ist im Vergleich zum Wildtyp-Proteinkomplex ein signifikanter Unterschied im Laufverhalten festzustellen, hierbei können aber keine Aussagen über Größenveränderungen getroffen werden. Sollte im Fall dieser Mutante tatsächlich eine MPT-Synthase, bestehend aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, generiert worden sein, so würde das eine unabhängige Funktion der beiden Hälften des Tetramers belegen. Durch weitere Experimente zur Massenbestimmung und Kristallisation der Mutante könnte diese These untersucht werden.

3.1.4 Die Reaktion von PrecursorZ zu MPT

Bei der Reaktion von PrecursorZ zu MPT werden zwei Schwefelatome übertragen. Unabhängig davon, ob die beiden Zentren der MPT-Synthase in irgendeiner Form miteinander kooperieren, müssen die Schwefelatome von zwei verschiedenen kleinen Untereinheiten stammen, da jede jeweils nur einen Carboxyl-Schwefel trägt. In der Struktur der MPT-Synthase wurde im aktiven Zentrum eine Differenzdichte festgestellt, dabei handelte es sich vermutlich um ein Chlorat. Nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, daß die kleine Untereinheit noch ein zweites Schwefelatom über eine Persulfidbindung gebunden trägt. Bei der Intein-Spaltung entsteht, wie die massenspektrometrischen Daten belegen, kein Persulfid, damit sind diese Vermutungen widerlegt. Zusätzlich zeigten Aktivitätsmessungen der MPT-Synthase unter Sulfid-Zugabe keine Auswirkungen auf die Reaktion.

Daraus resultierend kann man einen zwei-Schritt-Mechanismus der Schwefel-Assoziation mit damit verbundener Ringöffnung vermuten. Es ergeben sich dabei prinzipiell zwei verschiedene Reaktionswege. Zum einen könnte zuerst eine Schwefel-Addition an den C-1 Kohlenstoff der Seitenkette von PrecursorZ erfolgen, der resultierende hypothetische PrecursorG würde dann nach erfolgter Ringöffnung eine zweite Schwefel-Assoziation an den C-2-Kohlenstoff der Seitenkette erfahren (Abb.

3.2 oben). Ebenso könnte im ersten Schritt die Ringöffnung des zyklischen Phosphats erfolgen und die beiden Schwefel-Atome daraufhin sukzessive übertragen werden (Abb.3.2 unten). Hierbei wären prinzipiell beide C-Atome als Angriffspunkte für den initialen Austausch geeignet und potentielle Zwischenformen mit geöffnetem Phosphatring und einem Schwefelatom am C-1 Atom (PrecursorGO) oder C-2 Atom der Seitenkette könnten entstehen (PrecursorOG) (Abb.3.2 unten).

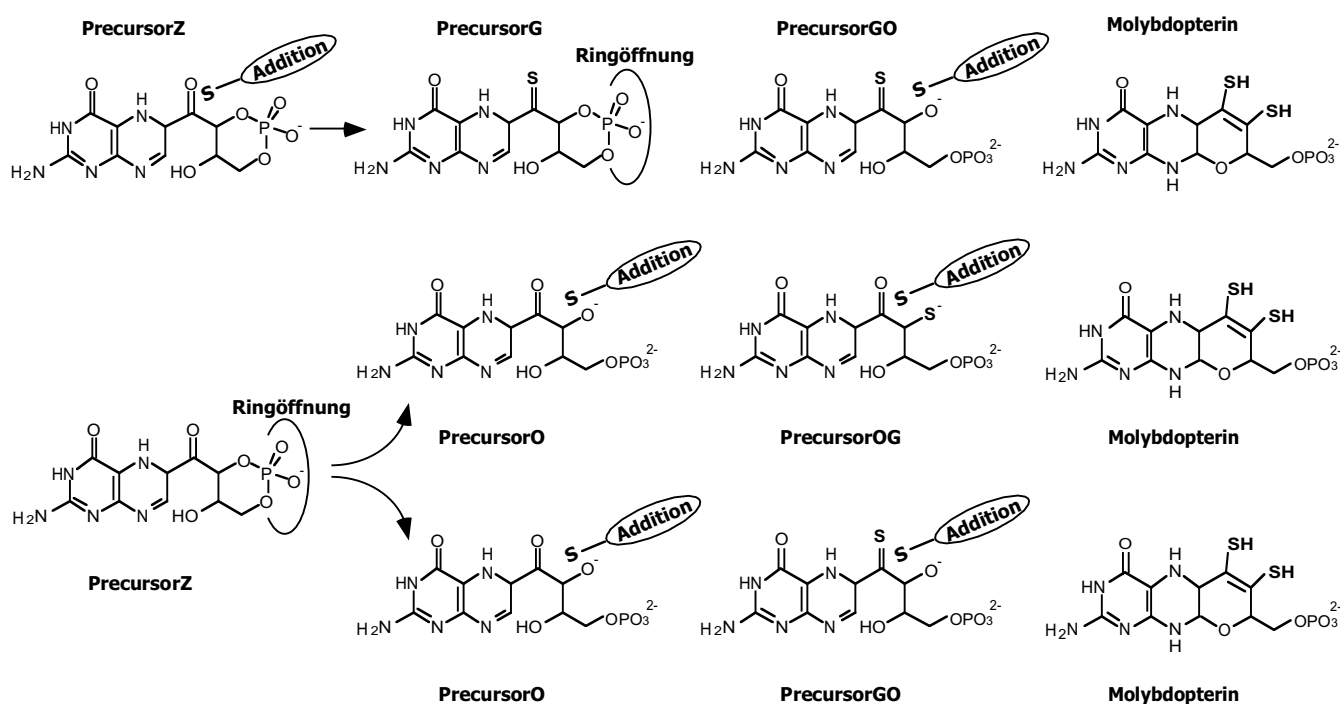


Abb. 3.2 Theoretische Reaktionswege der PrecursorZ Konversion

Im ersten Schritt könnten entweder eine Ringöffnung (unten) oder eine Schwefeladdition an das C-1 Atom der Seitenkette erfolgen (oben). Im zweiten Fall ergeben sich für die Schwefeladdition an den hypothetischen PrecursorO zwei initiale Angriffspunkte, im ersten Fall erfolgt nach der Ringöffnung des PrecursorG die Addition des Schwefels an das C-2 Atom. PrecursorZ ist in der offenen Form dargestellt, auch eine tricyclische Form unter Ausbildung eines Pyranorings wäre denkbar.

Bezieht man die MPT-Synthase Struktur in die Überlegungen zur Konversion von PrecursorZ mit ein, so bleiben die beiden Möglichkeiten, daß beide Hälften unabhängig arbeiten oder kooperieren.

Die Doppelmutante K37/F108A läßt eine unabhängige Funktionsweise der beiden Dimere vermuten, dagegen spricht jedoch die Lage der Aminosäurereste an Position 103 und 104 der großen Untereinheit. Sollten beide Hälften zusammenarbeiten, dann müßte ein Heterodimer den Zustand des anderen erkennen und auf die erste Schwefel-Übertragung mit einem konformellen Wechsel reagieren können. Die Seitenketten der Aminosäuren Histidin 103 und Arginin 104 liegen in räumlicher Nähe zum aktive Zentrum der anderen großen Untereinheit. Diese Aminosäuren könnten dem zweiten reaktiven Zentrum die Übertragung des ersten Schwefels signalisieren und ein darauf folgender Konformationwechsel des zweiten reaktiven Zentrums würde die Affinität zum ersten Zwischenprodukt der Reaktion erhöhen. Hier könnte dann der zweite Teil der Reaktion ablaufen (Abb. 3.2). Um diese Theorie zu untersuchen, sollten die beiden angesprochenen Aminosäurereste jeweils zu Alanin mutiert werden, was jedoch nur für Histidin 103 gelang. Diese Mutation scheint keine Auswirkungen auf die Funktionalität der MPT-Synthase zu haben, Histidin 103 wäre damit nicht an der Katalyse beteiligt. Sicherere Aussagen ermöglichen nur beide Mutanten bzw. eine zu generierende Doppelmutante.

Die Reaktion von PrecursorZ zu MPT sollte auch massenspektroskopisch durch zeitkinetische ESI-Messungen verfolgt werden, um ein hypothetisches Zwischenprodukt zu zeigen. Da aber schon PrecursorZ Schwierigkeiten in seiner Detektierbarkeit aufwies, kann nur eine um den Faktor 100–1000fache Anreicherung von PrecursorZ die massenspektroskopische Verfolgung der Reaktion ermöglichen.

Da die Spektren von PrecursorZ und MPT bekannt sind, könnte auch versucht werden, die Reaktion mittels sensitiver Dioden-Array basierter UV-Vis-Spektroskopie zu verfolgen, um die Anwesenheit eines Zwischenproduktes zu zeigen. Liegen bei einer Reaktion zwei spektroskopisch unterscheidbare Komponenten im Gleichgewicht vor und sind ohne Zwischenprodukt ineinander überführbar, so treten bei der spektroskopisch-zeitkinetischen Verfolgung dieser Reaktion isosbestische Punkte aufgrund von Veränderungen der chromophoren Systeme auf. Diejenige Wellenlänge, bei der beide Komponenten des Gleichgewichts den gleichen Absorptionskoeffizienten besitzen, wird als isosbestischer Punkt bezeichnet. So

konnte z.B. gezeigt werden, daß PrecursorZ ohne Ansammlung stabiler Intermediate zu CompoundZ oxidiert (Wuebbens, 1993).

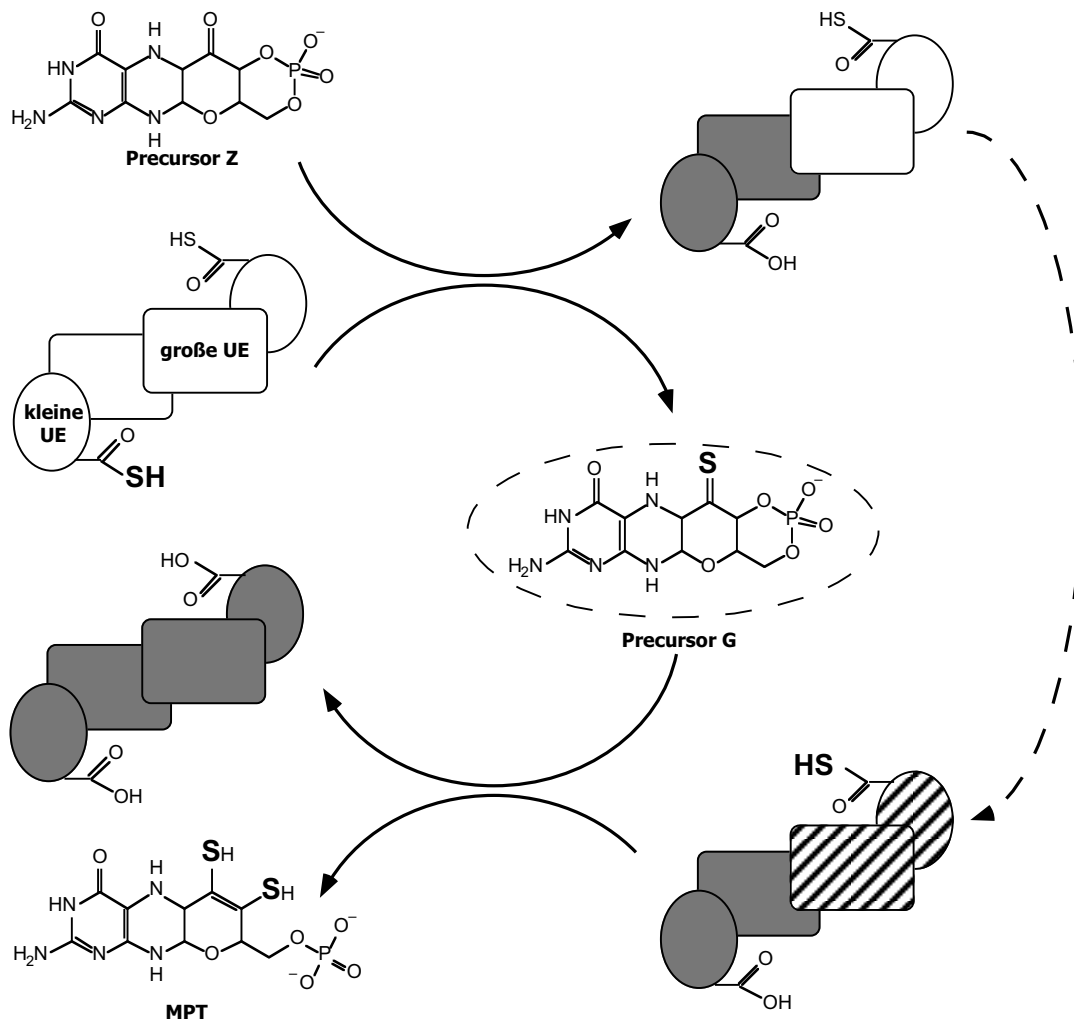


Abb. 3.3 Theoretischer Reaktionsmechanismus der MPT-Synthase bei Kooperativität der beiden aktiven Zentren

Nach Übertragung des ersten Schwefels reagiert das zweite aktive Zentrum der MPT-Synthase mit einem Konformationswechsel (schraffiert) und erhält daraufhin größere Affinität zum Intermediat der Reaktion (z.B. PrecursorG). Hier findet dann der zweite Teil der Konversion zu Molybdopterin statt. Anschließend müssen beide kleinen Untereinheiten dissoziieren, um wieder mit Schwefel beladen zu werden und der Zyklus kann erneut beginnen. Der PrecursorZ ist in der Pyranoform dargestellt, auch eine offene bicyclische Konformation ist denkbar.

3.1.5 Die Schwefelquelle der MPT-Synthase Reaktion in *E.coli*

Eine Beteiligung des ursprünglich als Sulfurylase bezeichneten MoeB Proteins an der Schwefelübertragung auf die kleine Untereinheit Moad wurde lange diskutiert (Pitterle *et al.*, 1993), obwohl sequenzielle Hinweise fehlten. Leimkühler *et al.* (2001) konnten zeigen, daß MoeB den C-Terminus der kleinen Untereinheit durch Adenylierung für die folgende S-Übertragung aktiviert. Die Aufklärung der Struktur eines heterotetrameren MoeB-Moad Komplexes (Lake *et al.*, 2002) belegte die Funktionalität von MoeB eindeutig. Demzufolge wäre eine von Leimkühler vorgeschlagene funktionelle Bezeichnung des MoeB Proteins als Adenylase sinnvoll (persönl. Kommunikation). Da die kleine Untereinheit wie gezeigt in aktiver Form als Thiocarboxylat vorliegt, sollte diese Reaktion von einem weiteren, bisher nicht beschriebenen Protein katalysiert werden.

Für IscS (iron sulfur cluster synthesis proteinS) konnte die Beteiligung an zahlreichen Schwefelaktivierungen wie der Biosynthese von Eisen-Schwefelclustern oder der Thiaminbiosynthese gezeigt werden (Abb. 3.4; Lauhon, 2000)

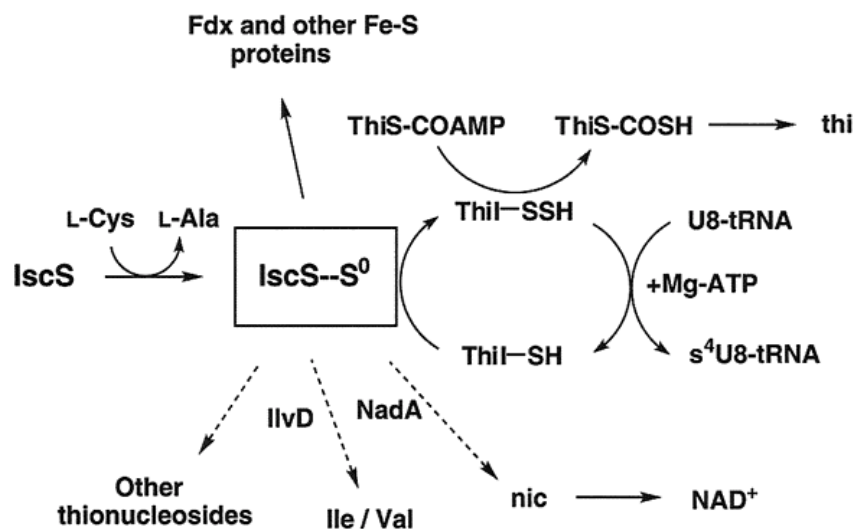


Abb. 3.4 Zentrale Rolle von IscS (nach Lauhon und Kambampati, 2000)

Eine Beteiligung von IscS an der Schwefelmobilisierung für diverse Stoffwechselwege konnte gezeigt werden. IscS desulfuriert L-Cystein und gibt den als Sulfan Atom über eine Persulfidbindung gebundenen Schwefel auf verschiedene Nutzer weiter.

Die Homologien zwischen den am Schwefeleinbau innerhalb der Thiamin-Biosynthese beteiligten Proteinen ThiI und ThiS und den am zweiten Schritt der Moco-Biosynthese beteiligten Proteinen MoeB und MoaD warf die Frage auf, ob IscS auch eine Funktion bei der S-Übertragung in der Moco-Biosynthese besitzt.

ThiS ist ein kleines Protein von 7,3 kDa mit terminalem Doppelglycin-Motiv, es wird analog zu dem zu 40% homologen MoaD zur Aktivierung adenyliert. Diese Reaktion übernimmt mit ThiF ein 26,2 kDa großes Protein, mit 62% Homologie zu MoeB. Anschließend erfolgt die Thiocarboxylierung des terminalen Glycins durch ThiI (54,9 kDa), dem innerhalb der Moco-Biosynthese kein Protein entspricht. IscS mobilisiert als Cysteindesulfurase den Schwefel für diese Reaktion aus L-Cystein.

Die Abb. 3.5 zeigt die Aktivierung und Thiocarboxylierung von MoaD analog zum Modell der ThiS-Aktivierung von Lauhon.

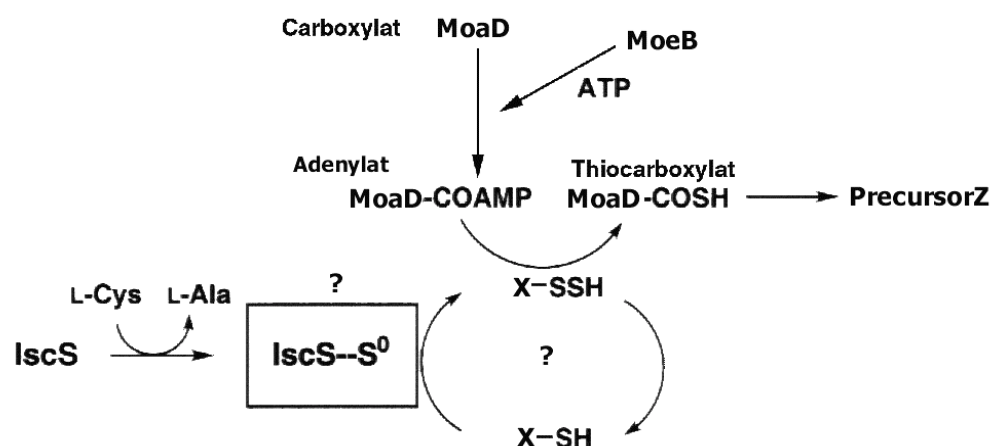


Abb. 3.5 Darstellung der hypothetischen MoaD-Aktivierung in Analogie zur Thiamin-Biosynthese

Die zur Thiamin-Biosynthese homologen Moco-Biosynthesepoteine sind analog zum Thiamin-Biosynthese-Modell der Abb. 3.4 dargestellt. Die Art der Schwefel-Mobilisierung ist hypothetisch.

Die Schwefelübertragung durch ThiS ist eine ein-Schwefel-Addition an einen Thiazol-Precursor unter hypothetischer Ausbildung eines Thioesters. Wie bei der Konversion von PrecursorZ zu MPT wird ein Sauerstoff einer OH-Gruppe gegen Schwefel ausgetauscht (Abb.3.6).

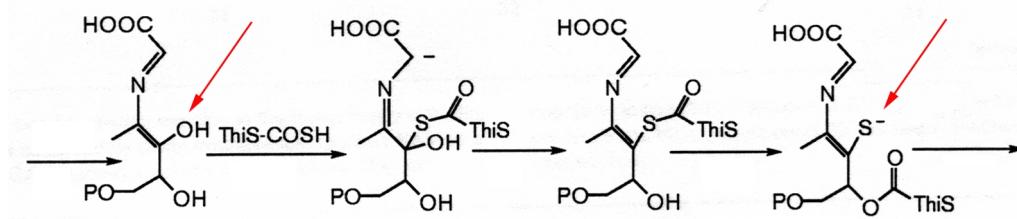


Abb. 3.6 Modell der Schwefelübertragung in der Thiamin-Biosynthese

Ausgehend von Thyrosin und Deoxy-D-xylose-5-phosphat wird Thiazol gebildet, mit Pyrimidinphosphat gekoppelt und zum Thiaminphosphat phosphoryliert. Hier ist ausschnittsweise die S-Addition an den Thiazol-Precursor gezeigt, nach anschließender Cyclisation, ThiS-Eliminierung und Decarboxylierung entsteht Thiazol (nach Begley, 2000).

Die generierte *iscS*-Mutante (Lauhon, 2001) wurde zur Untersuchung der Moco-Biosynthese zur Verfügung gestellt. Ein erster Test auf Nitratreduktaseaktivität war negativ. Diese fehlende Aktivität konnte auf Defekte in der Moco-Biosynthese oder einen Defekt im Apoprotein zurückzuführen sein, da die *E.coli* Nitratreduktase Eisen-Schwefelcluster enthält, für dessen Synthese IscS essentiell sein könnte. Um Aussagen über die MPT-Synthase-Aktivität der Mutante treffen zu können, wurden Proteinrohextrakte als MPT-Synthasequelle im *nit-1* Rekonstitutions-Assay untersucht. Die dabei ausgebliebene Aktivität des aerob angezogenen *iscS*-Mutantenextraktes war ein Hinweis für die Beteiligung von IscS an der Schwefelmobilisierung für die MPT-Synthase. Die Überexpression der *E.coli* MPT-Synthase unter einem starken IPTG-induzierbaren Promotor und Induktionsversuche verschiedener Molybdoenzyme mit anschließender MPT-Messung zeigte das (wenn auch im Vergleich zum Wildtyp reduzierte) Vorhandensein aktiver MPT-Synthase bzw. ihres Produkts Molybdopterin.

Die *iscS*-Mutante scheint einen induzierbaren Phänotyp aufzuweisen, bei dem die Gene des *moa*-Operons unter aeroben Bedingungen nicht mehr exprimiert werden. Eine nicht-redundante Bedeutung von IscS für Bereitstellung des Thiocarboxyl-Schwefels der kleinen Untereinheit kann damit ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit, daß verschiedene Sulfurasen sich funktionell ersetzen können und IscS neben anderen Enzymen Schwefel für die MPT-Bildung liefern kann, ist aber gegeben. Leimkühler und Rajagopalan (2001) untersuchten dazu IscS und die

Sulfurasen CSD und CsdB in einem *in vitro*-System. Dabei wurde versucht, inaktive MPT-Synthase durch die Co-Inkubation mit MoeB, Mg-ATP, L-Cystein und einer der drei Sulfurasen zu aktivieren. Prinzipiell zeigten MPT-Messungen nach PrecursorZ Zugabe, daß alle Sulfurasen in der Lage waren, die MPT-Synthase zu aktivieren. CSD erreichte Aktivitäten von 34 nmol MPT/nM Enzym, IscS 10 nmol MPT/nM Enzym und CsdB 0,4 nmol MPT/nM Enzym. Ob sich die gemessenen Enzyme auch *in vivo* ersetzen können und welches der natürliche Donor ist, bleibt zu klären.

3.1.6 Modell des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in *E.coli*

Die Untersuchungen zur bakteriellen MPT-Synthase in *E.coli* sind zusammenfassend in Abb. 3.7 in einem Modell der Konversion von PrecursorZ zu MPT mit den daran beteiligten Proteinen dargestellt.

Im heterotetrameren Komplex der Adenylase MoeB und der kleinen Untereinheit MoaD erfolgt die ATP-abhängige Aktivierung des C-terminalen Glycins von MoaD durch Adenylierung (Leimkühler *et al.*, 2001; Lake *et al.*, 2002). Die adenylierte kleine Untereinheit muß dann von einer noch unbekannten Sulfurase thiocarboxyliert werden. Dabei ist fraglich, ob die Sulfurase analog zu ThiI in der Thiaminbiosynthese den Schwefel von einer Cysteindesulfurase wie IscS bekommt (A) oder ihn selber mobilisieren kann (B). Die Versuche von Leimkühler und Rajagopalan (2001) zeigten zudem, daß *in vitro* auch eine direkte Weitergabe des Schwefels von einer Cysteindesulfurase auf aktivierte kleine Untereinheit möglich ist.

Der Schwefeldonor dieser Reaktion scheint nach *in vitro* Bestimmungen L-Cystein zu sein, die *in vivo* Situation ist ungeklärt. Die resultierende aktive Form der kleinen Untereinheit ist an ihrem C-terminalen Glycin thiocarboxyliert (Gutzke *et al.*, 2001) und bildet mit der großen Untereinheit einen heterotetrameren Komplex (Rudolph *et al.*, 2001; Gutzke *et al.*, 2001). *In vitro* bildet sich dieser aus monomeren Untereinheiten, MoaE dimerisiert erst durch Interaktion mit MoaD (Gutzke *et al.*, 2001). Die verschiedenen Reaktionswege der Einführung der Dithiolengruppierung in PrecursorZ sind in Abb. 3.2 gezeigt.

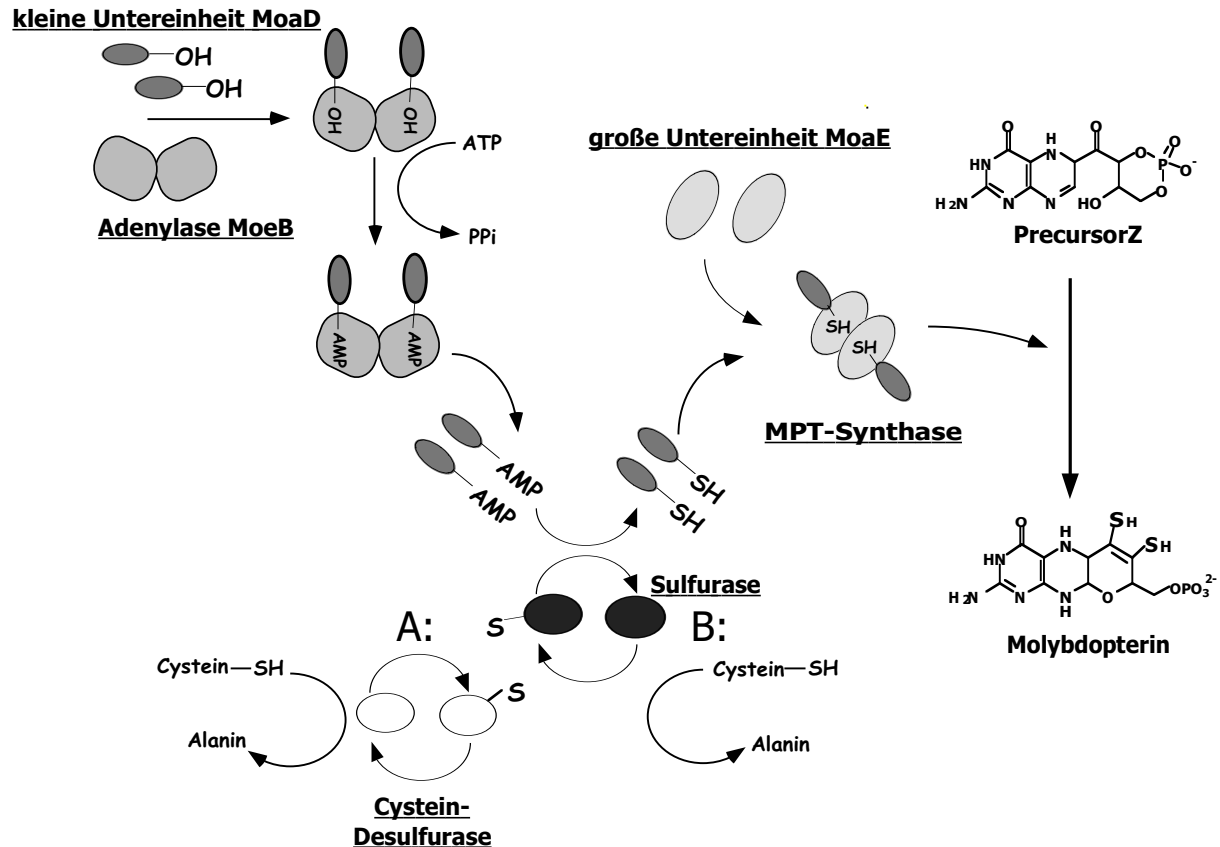


Abb. 3.7 Modell der Reaktion von PrecursorZ zu MPT in *E.coli*

Die Charakterisierungen der einzelnen Funktionen belegten, daß für die Reaktion neben den drei beschriebenen Proteinen MoeB, MoaD und MoaE noch mindestens ein Schwefel-übertragendes Protein beteiligt sein sollte. Die Thiocarboxylierungs-Reaktion der kleinen Untereinheit scheint von einer Cystein-Desulfurase auszugehen, die beteiligten Proteine und der Reaktionsweg sind noch nicht eindeutig identifiziert.

3.2 Eukaryontische MPT-Synthasen

Beispielhaft für eukaryontische Vertreter wurden pflanzliche (*A.thaliana*) und humane MPT-Synthase Proteine charakterisiert. Um ihre Funktionalität zu zeigen, wurden neben Komplementationsversuchen homologer prokaryontischer *E.coli* Mutanten *in vitro* Aktivierungs-Experimente durchgeführt. Einige diese Versuche wurden schon begleitend zur Identifizierung und Klonierung der Gene *mocs2A* und B bzw. *cnx5,6* und 7 von Stallmeyer (1998) und Nieder (1999) durchgeführt.

3.2.1 Mutanten-Komplementation

Bei der Reproduktion der Komplementationsversuche von Nieder (1999) war im Gegensatz zu den ursprünglichen Ergebnissen eine *moaE*-Mutantenkomplementation durch die heterologe Expression von *cnx6* möglich. Vermutlich lag das damals verwendete Plasmid nicht fehlerfrei vor. Die große Untereinheit der humanen MPT-Synthase (MOCS2B) konnte dagegen reproduzierbar die Mutante nicht komplementieren.

MoaE bildet in Prokaryonten mit der kleinen Untereinheit MoaD den heterotetrameren MPT-Synthase-Komplex, auch für *A.thaliana* konnte die Interaktion der beiden Proteine Cnx6 und Cnx7 *in vivo* gezeigt werden (Nieder, 1999 und 2.3.1.3). Fraglich bleibt, ob es sich bei der großen Untereinheit lediglich um eine schützende Proteinkomponente als "Plattform" zum Einbau der Dithiolengruppierung handelt, oder ob sie auch funktionell an der Reaktion beteiligt ist. Da für *E.coli in vitro* keine MPT-Bildung aus PrecursorZ mit alleiniger kleiner Untereinheit gezeigt werden konnte, ist auch eine mechanistische Beteiligung der großen Untereinheit nicht unwahrscheinlich. Da sie zudem keinerlei Homologien zu Proteinen anderer Stoffwechselwege aufweist, scheint sie in der Evolution speziell für diese Reaktion generiert worden zu sein, was vermutlich über eine reine PrecursorZ-Schutzfunktion hinausgeht.

Die Frage, warum es bei der Mutantenkomplementation einen Unterschied zwischen Cnx6 und MOCS2B gibt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Wären beide Proteine in der Lage, MoaE zu ersetzen, so würde die Theorie einer austauschbaren "Plattform" erhärtet werden. Es könnte sein, daß beide Proteine unterschiedliche posttranslationale Modifikationen benötigen und *E.coli* MOCS2B im Gegensatz zu Cnx6 nicht funktionell herstellen kann. Beide Proteine könnten sich auch hinsichtlich der chimärischen Interaktion mit der kleinen bakteriellen Untereinheit MoaD unterscheiden. Für Cnx6 konnte über die Mutantenkomplementation hinaus eine Komplexbildung mit MoaD durch Gelfiltration gezeigt werden, für MOCS2B war dies nicht möglich. Evolutive Veränderungen des humanen Proteins könnten die Erkennung der prokaryontischen kleinen Untereinheit im Gegensatz zu dem pflanzlichen Protein verhindern.

Um chimärische Interaktionen zwischen der Adenylase und den Untereinheiten der MPT-Synthase bei der Komplementation zu umgehen, sollten schrittweise alle drei pflanzlichen Proteine (Cnx5,6 und 7) in entsprechenden *E.coli* Mutanten gemeinsam exprimiert werden. Wie die Proteinstrukturen der heterotetrameren Komplexe der kleinen Untereinheit mit der Adenylase bzw. der großen Untereinheit der MPT-Synthase belegen, sind innerhalb dieses Biosyntheseabschnitts nicht nur die enzymatischen Proteinfunktionen wichtig, sondern diese ergeben sich erst durch die Interaktion der Proteine miteinander. Mit der gemeinsamen Expression von Cnx6 und Cnx7 sollte im ersten Schritt die Bildung einer chimären MPT-Synthase umgangen werden. Da aber wiederum im Gegensatz zu *moaE*-Mutanten keine Komplementation der *moaD*-Mutanten gelang, sollte mit der zusätzlichen Co-Expression von Cnx5 die chimäre Interaktion mit der Adenylase MoeB umgangen werden. Hierbei konnten erstmals Aktivitäten in *moaD* und *moeB*-Mutanten gemessen werden, die quantifiziert in einem Bereich von 10% der homolog komplementierten Mutanten lagen. Damit konnte für Cnx5 und Cnx7 eine funktionelle Beteiligung an der Moco-Biosynthese gezeigt werden. Die geringe Aktivität könnte auf uneffektive Schwefelübertragung zurück geführt werden. Aufgrund von Proteinextensionen sollte zwischen dem *E.coli* MoeB und den homologen eukaryontischen Proteinen ein Unterschied hinsichtlich ihrer Funktion bestehen. Für MoeB wurde die Adenylierung der kleinen Untereinheit gezeigt (Leimkühler, 2001 und Lake 2002). Alle eukaryontischen Vertreter und einige Prokaryonten besitzen über die Adenylase-Domäne hinaus eine C-terminale Rhodanese Domäne, die ihnen zusätzlich die Funktion einer Sulfurase ermöglichen könnte (siehe auch 3.4.2). Damit sind Unterschiede in der Schwefel-Übertragung und/oder Mobilisierung zwischen den kurzen *E.coli* ähnlichen Adenylasen und den verlängerten Rhodanese-fusionierten Adenylase-Sulfurasen offensichtlich. Diese Unterschiede könnten in der gemessenen Restaktivität von 10% resultieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre auch die problematische funktionelle Expression von Cnx5 in *E.coli*. Lösliches Protein war nur in geringsten Mengen mittels Antikörper-Detektion nachzuweisen, hier könnte nicht nur ein Mengen- sondern auch ein funktionelles Expressionsproblem zu den geringen gemessenen Aktivitäten führen.

3.2.2 Aktivitätsmessungen eukaryontischer MPT-Synthase und bakterieller Chimären

Um funktionelle eukaryontische MPT-Synthase zu generieren und ihre Aktivität zum *E.coli* Enzym in Relation setzen zu können, wurde auf das Intein-System zurückgegriffen. Hiermit konnte zwar aktive pflanzliche Untereinheit erzeugt werden, die Aktivität lag jedoch im Vergleich zur bakteriellen MPT-Synthase nur etwa bei 5%. Ursache hierfür scheint die kleine Untereinheit zu sein, da die große pflanzliche Untereinheit mit kleiner thiocarboxylierter bakterieller Untereinheit Aktivitäten von 50% erreichen konnte. Diese chimärische Aktivität war durch die *moaE*-Mutantenkomplementationen durch *cnx6* zu erwarten. Ob die *in vitro* erzeugte thiocarboxylierte pflanzliche kleine Untereinheit aufgrund von Fehlfaltungen oder fehlender posttranslationaler Modifikationen im Komplex mit der großen Untereinheit nicht die Umsatzraten des bakteriellen Enzyms erreicht, konnte nicht geklärt werden. Gegen eine generell geringere eukaryontische MPT-Synthase Aktivität spricht vor allem der rein eukaryontische Komplex aus thiocarboxyliertem MOCS2A und Cnx6. Die Aktivitäten der humanen MPT-Synthase lagen bei 1,4 %. Hier scheint die große Untereinheit, wie durch die Komplementationsergebnisse zu vermuten war, ein Problem darzustellen. Auch im chimären Komplex mit thiocarboxyliertem MoaD konnte keine Steigerung der Aktivität von MOCS2B erzielt werden. MOCS2A hingegen erreichte im chimärischen Komplex mit MoaE Aktivitäten von 12%.

Im humanen System ergaben sich demnach Probleme durch die große Untereinheit, während im pflanzlichen System die kleine Untereinheit für die geringen Aktivitäten verantwortlich war. Durch die Kombination der beiden aktiven Teile pflanzlicher und humaner MPT-Synthase konnte mit 31% im Vergleich zum homologen bakteriellen Komplex deutliche Aktivität eines eukaryontischen Komplexes erzielt werden.

Die nach den Mutanten-Komplementationen denkbare Möglichkeit, daß in Pro- und Eukaryonten leicht verschiedene Varianten des PrecursorZ vorliegen und deshalb die eukaryontischen MPT-Synthasen diesen schlechter umsetzen, ist damit unwahrscheinlich.

Die alleinige Aktivität von thiocarboxyliertem MoaD konnte wie diskutiert auf *nit-1* Interaktion mit der *N.crassa* großer Untereinheit zurückgeführt werden. Theoretisch hätte aufgrund der gezeigten potentiellen Aktivität von MOCS2A mit Cnx6 bzw. MoaE auch eine Interaktion mit dem entsprechenden *N.crassa* Protein CnxH (vgl.2.7.2.1)

möglich sein sollen. Das offensichtliche Ausbleiben dieser Interaktion sollte auf eine Nichterkennung zurückzuführen sein, da beide Komponenten jeweils mit anderen Partnern aktiv waren.

3.2.3 Modell des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in Eukaryonten

In Pro- und Eukaryonten scheint vor allem ein Unterschied hinsichtlich der Aktivierung der kleinen Untereinheit zu bestehen. Die Abbildung 3.8 zeigt ein zusammenfassendes eukaryontisches Modell der Reaktion von PrecursorZ zu MPT mit den beteiligten Proteinen.

Die Interaktion der Adenylase-Sulfurase und der kleinen Untereinheit konnte durch Nieder (1999) im Two Hybrid System gezeigt werden. Vermutlich verläuft aufgrund der homologen Adenylase Domäne die Aktivierung des C-Terminus durch Adenylierung vergleichbar zu *E.coli* MoeB.

Die eukaryontischen MoeB homologen Proteine besitzen eine zusätzliche Rhodanese Domäne. Rhodanesen sind Sulfurtransferasen, die den Transfer eines Schwefel-Atoms von einem Sulfan-Schwefel enthaltenden Donormolekül auf ein thiophiles Akzeptormolekül katalysieren. Diese Rhodanese-Domäne existiert nicht ausschließlich bei eukaryontischen MoeB-Vertretern, sondern konnte auch bei einigen Prokaryonten wie *Mycobakterium tuberculosis* oder *Synechocystis spec.* identifiziert werden. Damit ist sie kein rein eukaryontisches Merkmal und eine Domänenfusion könnte damit vor der Trennung von Pro- und Eukaryonten erfolgt sein. Die so verlängerten MoeB-Proteine könnten die in *E.coli* und den meisten Prokaryonten vakante Sulfurase Funktion mit übernehmen und nach der Adenylierung auch die Thiocarboxylierung der kleinen Untereinheit katalysieren.

Der Schwefel für diese Reaktion könnte homolog zu *E.coli* in Eukaryonten wiederum von einer Cysteindesulfurase mobilisiert werden. Sollte in *E.coli* IscS an dieser Reaktion beteiligt sein, so wäre eine vergleichbare Rolle der identifizierten eukaryontischen Vertreter des humanen und pflanzlichen Systems ebenso zu erwarten, da der Homologiegrad mit über 50% Identität signifikant hoch war (2.2.1.4).

Unterschiede in der eigentlichen Konversionsreaktion sind nicht zu vermuten. Auffällig war jedoch, daß sowohl Cnx6 als auch MOCS2B in der Gelfiltration im Gegensatz zu MoaE in dimerischer Form vorlagen. Die evolutive Weiterentwicklung könnte zu dem stärkeren Dimerisierungsverhalten der eukaryontischen großen Untereinheiten geführt haben, während diese in *E.coli* erst durch die Anwesenheit kleiner Untereinheit induziert wird. Ob diese Beobachtung aus *in vitro* Versuchen allerdings *in vivo* Gültigkeit hat, mag fraglich sein. In *E.coli* werden die beiden MPT-Synthase-Gene in einem Operon co-exprimiert und die Proteine sollten sofortigen Kontakt bekommen. In *A.thaliana* liegen die Gene auf verschiedenen Chromosomen und eine sofortige Dimerisierung der großen Untereinheit ohne vorherigen Kontakt zu kleiner Untereinheit wäre sinnvoll. Im humanen System hingegen sollte aufgrund der bicistronischen Lokalisierung und Expression der Gene (Stallmeyer *et al.*, 1999) diese Entwicklung nicht vordringlich gewesen sein.

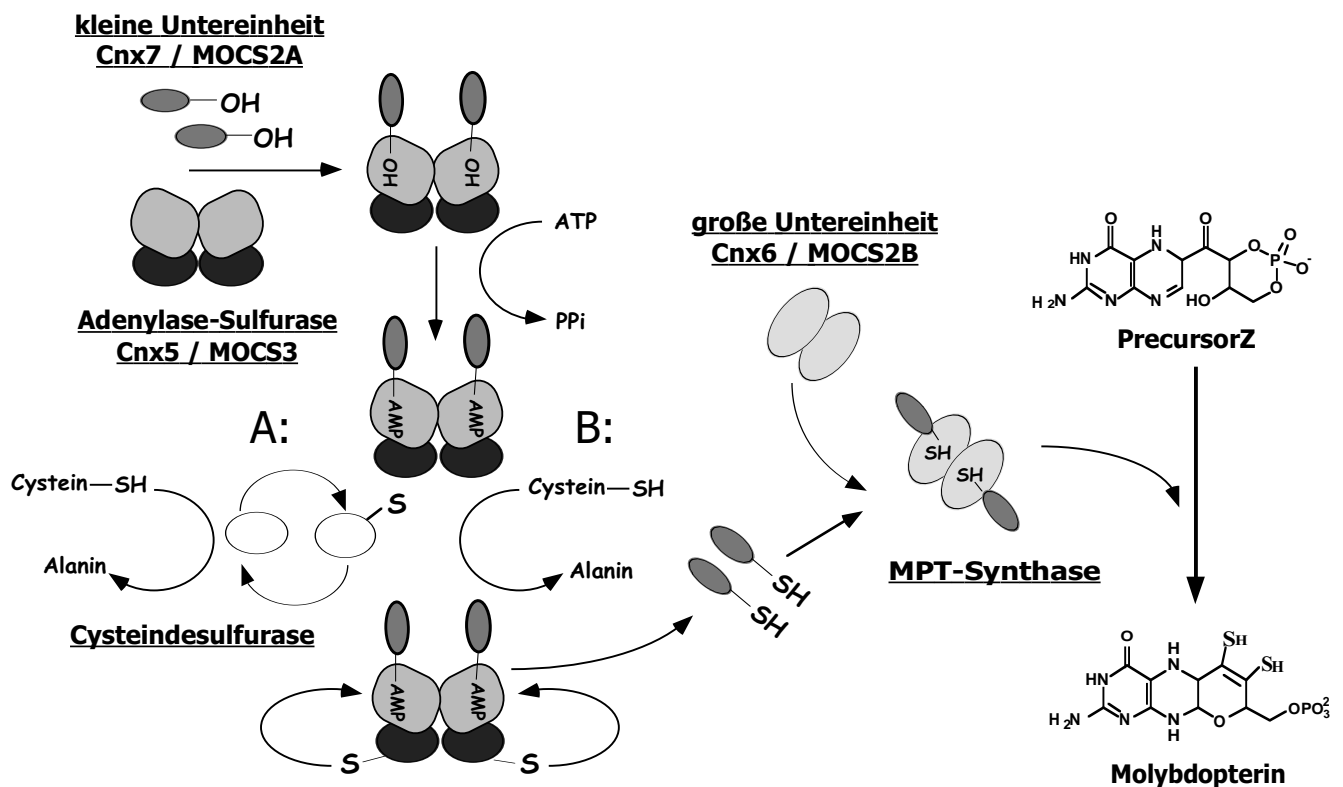


Abb. 3.8 Modell der Reaktion von PrecursorZ zu MPT in Pflanzen und Menschen

Neben den allgemeinen Funktionsbezeichnungen ist die Nomenklatur der pflanzlichen (Cnx) und humanen (MOCS) Proteine angegeben. A zeigt die hypothetische S-Mobilisierung durch eine Cystein-Desulfurase, B die hypothetische Mobilisierung des Schwefels durch die Sulfurase-Domäne selbst.

3.3 Mutanten des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese in Pflanzen und Pilzen

Die letztendlich auf einen Ausfall der Nitratreduktase zurückzuführende Chloratresistenz ermöglichte die Isolierung von *A.thaliana* (Braaksma und Feenstra 1972/1982; Crawford 1992) und *N.crassa* Moco-defizienten Mutanten (Tomsett und Garret 1980).

3.3.1 Die *chl-5* Mutante in *A.thaliana*

In *A.thaliana* wurden sieben *chl*-Mutanten beschrieben, von denen bis auf *chl-5* alle einem Gendefekt zugeordnet werden konnten. Da die Mutation von *chl-5* ebenso wie die Position von *cnx6* auf Chromosom II gemappt wurde, war die Wahrscheinlichkeit, hiermit die erste pflanzliche Mutante des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese zu beschreiben, gegeben.

Die Mutation konnte nach Sequenzierung als ein Cytosin zu Thymin Austausch an Nukleotid-Position 264 identifiziert werden. Dieser Austausch an der ersten Stelle eines codierenden Triplets führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Phenylalanin (Position 89). Die Mutation liegt in einem konservierten Bereich des Proteins. Alle eukaryontischen Sequenzen weisen an der mutagenisierten Position ein Leucin auf, zudem ist dieses von einem invarianten Histidin (Position 87) und einem invarianten Glycin (Position 90) flankiert. Der Austausch der aliphatischen Aminosäure Leucin gegen die stark hydrophobe Aminosäure Phenylalanin sollte einen strukturellen Einfluß auf die Faltung des Proteins haben. Setzt man die Mutation des pflanzlichen Proteins in Bezug zu der bakteriellen MoaE-Struktur, so läge die Mutation zwischen dem 4. und 5. Faltblatt (Abb. 3.9) Da kein unmittelbarer Bezug zum aktiven Zentrum des Proteins hergestellt werden kann und die Dimerisierung der beiden großen Untereinheiten ebenfalls nicht direkt betroffen zu sein scheint, spricht alles für eine grundlegende strukturelle Veränderung von Cnx6, die in einem Funktionsverlust resultieren würde.

Biochemische Charakterisierungen könnten die Auswirkung der Mutation über die grundlegende Charakterisierung des chloratresistenten Phänotyps hinaus zeigen. Eine Precursor Z-Akkumulation sollte nachzuweisen sein und *chl-5* Extrakte müßten damit die Salzfraktion von *nit-1* im gelfiltrierten Rekonstitutions-Assay ersetzen

können. Hiermit könnte endgültig auch der Beweis geliefert werden, daß sich zumindest pflanzlicher und pilzlicher PrecursorZ austauschen lassen. Ebenso könnte die Komplementation der pflanzlichen *chl-5* Mutante durch Transformation mit dem homologen Wildtyp-*cnx6* die genetische Charakterisierung bestätigen.

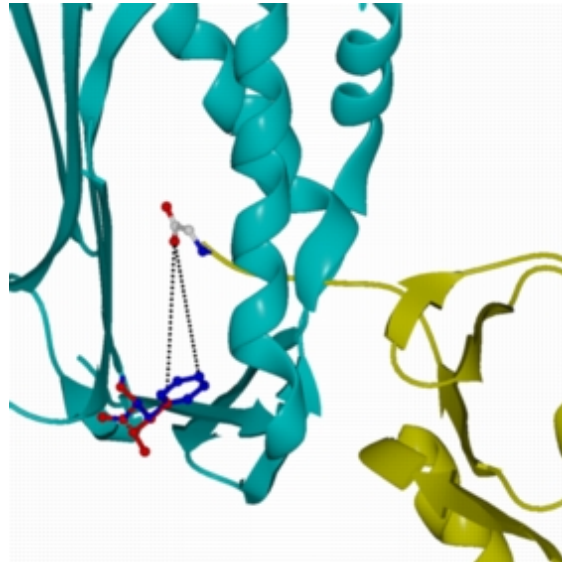


Abb. 3.9 Mutation des *chl-5* Proteins übertragen auf die homologe *E.coli* Struktur

Die Seitenketten des WT-Leucins (rot) und des *chl5*-Phenylalanins (blau) der großen Untereinheit (türkis) und des terminalen Glycins der kleinen Untereinheit (gelb) sind hervorgehoben. Der berechnete Abstand des terminalen Glycins der kleinen Untereinheit zum Phenylalanin beträgt ca. 10 Å, der zu Leucin ca. 10,5 Å.

3.3.2 Die *N. crassa* Gene des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese und ihre Mutation in *nit-1* und *nit-8*

Durch Datenbankanalysen wurden die Gene der kleinen und großen Untereinheit der MPT-Synthase sowie der Adenylase-Sulfurase isoliert und werden im folgenden gemäß der für *Aspergillus* eingeführten Pilznomenklatur mit *cnxG*, *cnxH* und *cnxF* bezeichnet.

Die aus 99 Aminosäuren bestehende kleine Untereinheit CnxG besitzt im N-terminalen Bereich eine zehn Aminosäuren lange Extension im Vergleich zu *E.coli* MoaD. Am konservierten C-Terminus ist eine sequenzielle Besonderheit auffällig. Das terminale Doppelglycin-Motiv, das sowohl in bakteriellen (z.B. Rivers *et al.*, 1993), pflanzlichen (Nieder, 1999) und humanen (Stallmeyer *et al.*, 1999) kleinen Untereinheiten existiert, ist wie bei *A.nidulans* (Appleyard, 1998) durch ein Serin-Glycin-Motiv ersetzt. Damit ist auch für das *A.nidulans* Protein ein vorher

diskutierbarer Sequenzierfehler auszuschließen und dieser C-Terminus als pilzliche Besonderheit anzusehen. Untersuchungen zur Aktivität C-terminal veränderter Moad-Proteine in *E.coli* belegen, daß eine andere sterisch kleine Aminosäure an der vorletzten Position keinen Aktivitätsverlust zu Folge haben muß. So führt hier ein Austausch gegen Alanin nur zu einer leicht verminderten Aktivität und ein Austausch gegen Valin läßt ebenfalls deutliche Restaktivitäten zu (Hänzelmann *et al.*, 2002). Betrachtet man die Sequenzunterschiede der großen Untereinheiten im Bereich der Interaktion mit der jeweiligen kleinen Untereinheit (übertragen auf die bekannte *E.coli* Struktur), so ist der in Abb. 3.10 gezeigte Ausschnitt des Alignments zwischen der α -Helix 3 und dem β -Faltblatt 7 interessant. Die prokaryontischen Sequenzen weisen vor dem invarianten Tryptophan (5. AS des Ausschnitts) ein Phenylalanin auf, in den pilzlichen Sequenzen könnte diese Aminosäure mit der Seitenkette des Serins an vorletzter Position der kleinen Untereinheit sterisch interferieren und deshalb gegen Valin ausgetauscht sein. *Synechocystis spec* und die gezeigten eukaryontischen Sequenzen besitzen an dieser Position ein Isoleucin, ob eine um eine CH_3 -Gruppe längere Seitenkette in den pilzlichen Sequenzen Schwierigkeiten bei der Interaktion der Untereinheiten hervorrufen könnte, ist fraglich. Obwohl man also Veränderungen der großen Untereinheit als Folge des Serin-Glycin Motivs der kleinen Untereinheit diskutieren kann, bleibt seine Bedeutung ungeklärt. Da keine direkte Beteiligung an der Katalyse vorliegen sollte, ist eine strukturelle Bedeutung wahrscheinlich.

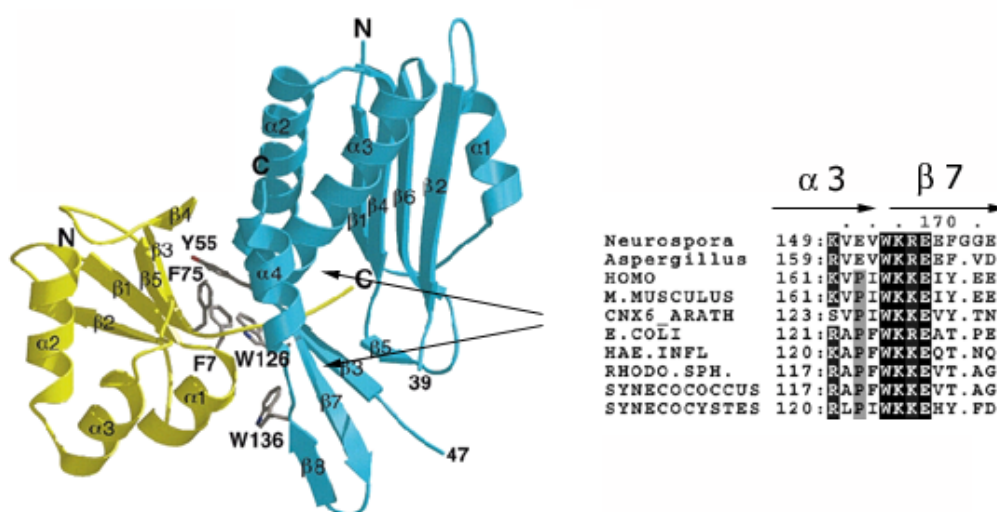


Abb. 3.10 Ausschnitt des Aminosäure-Sequenz-Alignments großer Untereinheiten im Bereich der Interaktion mit der jeweiligen kleinen Untereinheit

Die große Untereinheit CnxH ist mit 206 Aminosäuren um 56 Aminosäuren größer als das homologe *E. coli* Protein MoeB. Am N-Terminus existiert eine 30 Aminosäuren und am C-Terminus eine 33 Aminosäuren lange Extension. Die Funktion der Extensionen ist fraglich, eindeutige Sequenzmotive wie Leitsequenzen sind ebenso nicht zu finden wie Homologien zu anderen Proteinen. CnxH hat ein Intron, das im konservierten, zu *moaE* homologen Bereich liegt und damit nicht die Extensionen gegenüber der Kerndomäne trennt.

Die Adenylase-Sulfurase CnxF ist 586 Aminosäuren lang und weist am N-Terminus eine 126 Aminosäuren- und am C-Terminus eine 174 Aminosäuren große Extension im Vergleich zu *E.coli* MoeB auf. Die C-terminalen Extensionen bei *N.crassa* und *A.nidulans* sind mehr als doppelt so lang, wie bei den pflanzlichen und humanen Vertretern (siehe Abb. 3.10). Eine Grund dafür konnte bisher nicht gezeigt werden. Da der Translationsstart für *N.crassa* CnxF nicht eindeutig definiert werden konnte, ist die N-terminale Extension hypothetisch und muss erst durch die Isolierung der cDNA bestätigt werden. Funktionell könnte die Extension eine Leitsequenz beinhalten oder auch zusätzliche Proteininteraktion vermitteln, sequenzielle Belege fehlen jedoch. Die C-terminale Domäne besitzt wie andere bekannte eukaryontische Homologe eine Rhodanese Domäne. Im Alignment der C-terminalen Domänen der MoeB-homologen MOCS3, Cnx5 und CnxF mit der *E.coli* Rhodanese GlpE ist das funktionell an der Schwefelübertragung beteiligte Cystein in allen Vertretern konserviert (Pos. 91 im Alignment).

```

      . . . . .10 . . . . .20 . . . . .30 . . . . .40 . . . . .50
Mocs3_H.sapiens 1:LLSPEERVSVTDYKRLLDSGAFHLLLDVFPQVEVDICRLPHALHPLKHL: 50
Cnx5_A.thaliana 1:..LPAESRISSKEFKKILQKKEQHVLDDVRPSSHYYKIVSLPDSLNTSLANL: 49
CnxF_N.crassa 1:.....VQKNDGNGKGKKYVVLDTREKEHFSFGSIEGAVNLPFGKL: 40
GlpE_E.coli 1:..MDQFECINVADAEKQLQKEKE.AVLVDTRDPQSFAMGHAVQAFHITNDTTL: 48

      . . . . .60 . . . . .70 . . . . .80 . . . . .90 . . . .100
Mocs3_H.sapiens 51:ERRDAESLKLKKEAIWEEKQ.....GTQEGAAPVTVVICKKLGNDSQKA: 93
Cnx5_A.thaliana 50:ETRLNELTSALKEK.GNGHA.....NTESCTNPSTLVVCCRGNDSQRA: 91
CnxF_N.crassa 41:LSKAAQLKRSGETPKVGDILPPEIQVRDGHGDKDIPVTVVCCRGLDSQEA: 90
GlpE_E.coli 49:G....AFMR.....DNDFDTPVMVMCYHGNSSKGA: 74

      . . . . .110 . . . . .120 . . . . .130 . . . . .140
Mocs3_H.sapiens 94:VKILQSLSAAQELDPLTVRDVVGGLMAWAAKIDGTFPQY.:132
Cnx5_A.thaliana 92:VQYFR...ESGFD..SAKDTIGGLEAWAANVNPFPY.:124
CnxF_N.crassa 91:VEKLKEMGLDNGGSR.KIVDTAGGMKAWKEQVDPSPFYL.:128
GlpE_E.coli 75:AQYLL....QQGYD..VVYSIDGGFEAWQRQFPAEVAYGA:108

```

Abb. 3.11 C-terminales Alignment der Rhodanese Domänen mit *E.coli* GlpE

Die Rhodanese GlpE aus *E.coli* (NC_002689) hat signifikante Homologien zum C-Terminus der eukaryontischen MoeB-Vertreter. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hervorgehoben.

Stellt man den Reaktionsmechanismus einer Rhodanese dem hypothetischen Mechanismus der fusionierten MoeB Vertreter gegenüber, so wird der zu übertragende Schwefel jeweils als Persulfid an die SH-Seitengruppe des Cysteins gebunden. Im Falle der Übertragung auf CnxG könnten beide Proteine eine intermediäre Thioesterbindung eingehen (Abb. 3.12). Dem C-Terminus könnte somit die diskutierte Sulfurtransferase-Aktivität zugeschrieben werden (vgl. auch 3.5).

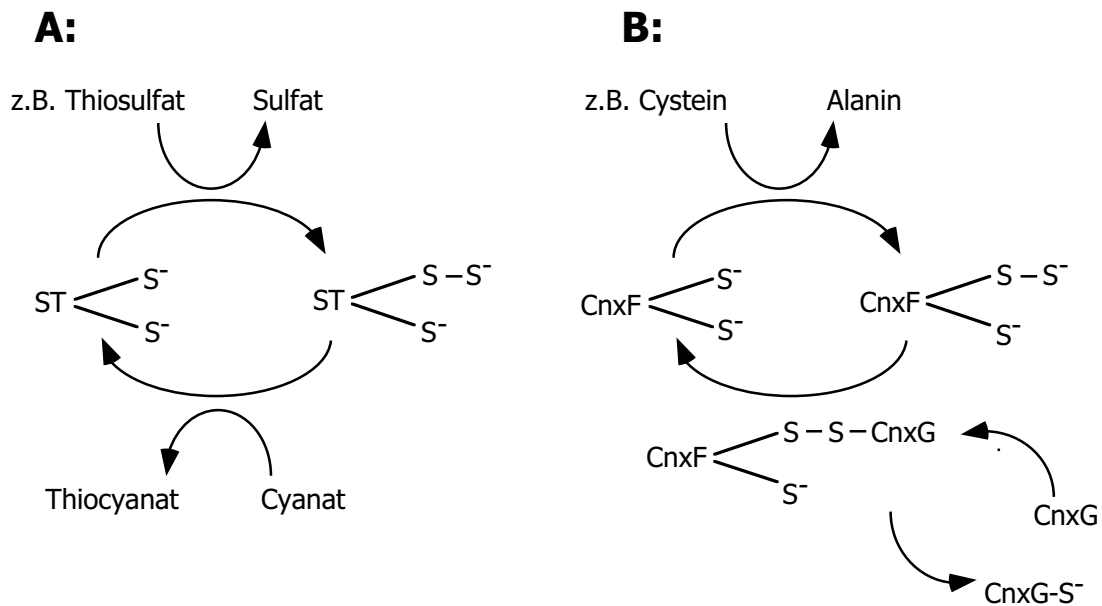


Abb. 3.12 Vergleich der hypothetischen Reaktionsmechanismen einer Rhodanese mit der Schwefelübertragung von CnxF auf CnxG

A: zeigt die Schwefelübertragung einer Thiosulfat-Cyanid-Sulfurtransferase (ST), der zu übertragende Schwefel wird als Persulfid gebunden. B: zeigt eine vergleichende Darstellung der hypothetischen Schwefelübertragung auf die kleine Untereinheit (CnxG), dabei könnten beide Proteine eine intermediäre Thioesterbindung eingehen.

Die bisher identifizierten eukaryontischen Vertreter der Adenylase-Sulfurasen mit Ausnahme von *Porphyra purpurea* und alle Rhodanese-fusionierten prokaryontischen Proteine besitzen ein konserviertes C-terminales Tyrosin, dessen Funktion bisher nicht charakterisiert werden konnte, aber z.B. Angriffspunkt posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung sein könnte. Die *Neurospora*-Sequenz stellt einen zweiten Vertreter mit fehlendem Tyrosin-Motiv dar. Ein Sequenzierfehler kann ausgeschlossen werden, da sowohl die Datenbank- als auch die *nit-1* und *nit-8* Sequenzen übereinstimmend das Motiv bestätigten. Die Abbildung 3.13 zeigt die

Extensionen der identifizierten *N.crassa* Proteine im Vergleich zu anderen eukaryontischen Sequenzen und zu den entsprechenden *E.coli* Proteinen.

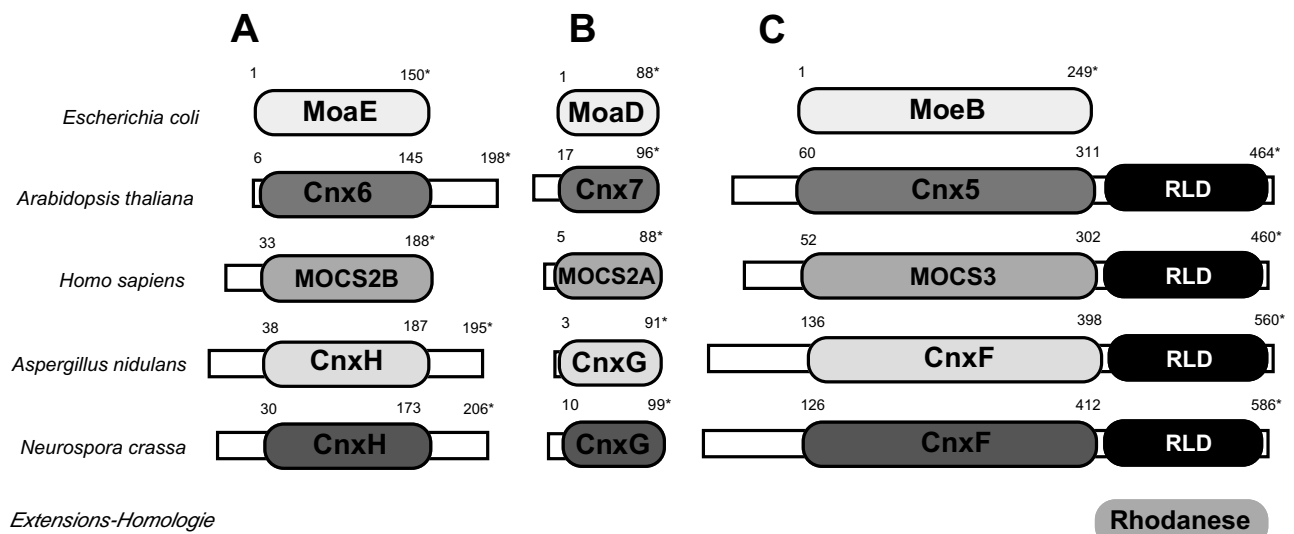


Abb. 3.13 Domänen-Vergleich der isolierten *N.crassa* Proteine des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese mit denen anderer Organismen

A zeigt die Sequenzen der großen Untereinheiten, B die der kleinen Untereinheiten und C die der MoeB homologen Proteine. Die Zahlen an den einzelnen Protein-Boxen kennzeichnen die Aminosäurepositionen. (RLD: Rhodanese like domain).

3.3.2.1 Die Mutation in *nit-1*

Die Sequenzen der kleinen und großen Untereinheiten entsprechen in der *Neurospora* Mutante *nit-1* den Wildtypsequenzen. Obwohl in der Sequenz des Adenylase-Sulfurase Gens *cnxF* zuerst zahlreiche Mutationen gefunden wurden, konnte nur eine als echt bestätigt werden, da die Datenbank-Sequenz fehlerhaft war. An Nukleotidposition 477 tritt im ersten Intron eine Einbasenpaar-Deletion auf. Diese Mutation im nicht translatierten Bereich des Gens läßt keine Rückschlüsse auf das exprimierte Protein zu. In Versuchen, die cDNA aus aufgereinigter RNA mittels RT-Reaktion zu gewinnen, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Da aber erhaltene Amplifikate der beiden Untereinheiten der MPT-Synthase auf genomische DNA-Verunreinigungen zurückzuführen waren, ist eine eindeutige Aussage über die Transkription nicht möglich. Die Expression muß durch Western- und Northern-Analysen untersucht werden. Mittels *in vitro* Assays könnte die Funktionalität der

aufgereinigten Adenylase-Sulfurase aus *nit-1* untersucht werden. In der Mutante könnte sich der heterotetramere Komplex aus Adenylase-Sulfurase und kleiner Untereinheit aufgrund struktureller Veränderungen nicht mehr bilden, außerdem könnte funktionell die Aktivierung der kleinen Untereinheit durch Adenylierung ausbleiben oder sich die Mutation auf die Schwefelübertragung durch die Sulfurase-Domäne auswirken (Abb. 3.14). Letztendlich wird die kleine Untereinheit nicht sulfuriert und liegt als Adenylat oder nicht modifiziertes Carboxylat vor. Aktive MPT-Synthase kann sich nicht bilden, und in der Mutante akkumuliert PrecursorZ, was dem Phänotyp der *nit-1* Mutante entspricht. Eine *in vitro* Komplementation des *nit-1* Rekonstitutions-Assays sollte damit durch die Zugabe von thiocarboxylierter kleiner Untereinheit oder aktiver Adenylase-Sulfurase zum *nit-1* Extrakt möglich sein.

Sollte die identifizierte Mutation keine Auswirkungen auf die Adenylase-Sulfurase haben, könnte eine weitere hypothetische Mutation den Promotorbereich von CnxF oder CnxH betreffen. Eine Mutation im Promotor von CnxG ist auszuschließen, da für die Mutante *nit-8* eine Mutation in CnxG gezeigt wurde und beide Mutanten gemäß ihrer Klassifizierung in unterschiedlichen Genen defekt sein sollten (Tomsett und Garret, 1980). Außerdem könnte das noch unbekannte Protein betroffen sein, welches an der Mobilisierung des Schwefels beteiligt sein sollte und den Schwefel für die Adenylase Sulfurase liefert. Die Abbildung 3.14 zeigt die möglichen Auswirkungen einer hypothetischen Mutation in diesem Enzym. Sollte der Schwefel nicht von L-Cystein auf das hypothetische Schwefel mobilisierende Enzym übertragen werden oder die Weitergabe an die Adenylase-Sulfurase blockiert sein, so könnte die kleine Untereinheit nach Adenylierung nicht mehr sulfuriert werden.

Die Zugabe von thiocarboxylierter kleiner Untereinheit bzw. aktivem Schwefel mobilisierenden Enzym zum *nit-1* Extrakt sollte in diesem Fall eine Komplementation im *nit-1* Assay ermöglichen.

3.3.2.2 Die Mutation in *nit-8*

Die Sequenz der großen Untereinheit *cnxH* entspricht in der *N.crassa* Mutante *nit-8* der Wildtypsequenz. Die analysierte Sequenz der Adenylase-Sulfurase *cnxF* in *nit-8* besitzt zwei Mutationen. Ein Austausch eines Guanidin gegen ein Adenosin ist an Nukleotidposition 184 in einem Intron zu finden. Die zweite Mutation tritt an Position 1186 auf, wobei ein zusätzliches Thymidin in die Sequenz eingefügt ist. Da nur ein unabhängiges PCR-Amplifikat sequenziert wurde, sollten diese Mutationen auf PCR-Mutationen zurückzuführen sein und müssen durch erneute PCR-Amplifikation untersucht werden.

In der Sequenz von *CnxG* trat in allen fünf unabhängigen PCR-Klonen an der Nukleotidposition 249 eine Einbasenpaar-Deletion auf. Das fehlende Thymidin verursacht einen Frameshift. Ab der Aminosäureposition 83 wechselt der translatierte Leserahmen, dadurch gehen die letzten 16 Aminosäuren des Wildtypproteins verloren und werden durch 29 neue Aminosäuren ersetzt. Das resultierende Protein hat eine Länge von 112 Aminosäuren. Der konservierte C-Terminus des Wildtypproteins wird in *nit-8* nicht mehr translatiert und das C-terminale Serin-Glycin-Motiv existiert in der *nit-8* kleinen Untereinheit nicht mehr. Da dieser konservierte C-Terminus eine essentielle Bedeutung bei der Schwefelübertragung besitzt, ist das entstehende Protein funktionslos. Die Struktur der *nit-8* kleinen Untereinheit ist so stark verändert, daß bereits die Zusammenlagerung mit der Adenylase-Sulfurase zu einem Komplex nicht mehr möglich scheint und sie damit nicht mehr aktiviert werden kann. (Abb. 3.14) Eine *in vitro* Komplementation durch extern zugegebene, carboxylierte kleine Untereinheit sollte möglich sein, da die aktivierenden Proteine in *nit-8* funktionell sind.

Da die Mutanten bisher nur auf DNA-Ebene charakterisiert wurden, müssen die Ergebnisse durch Expressions-Studien, biochemische Analysen und die angesprochenen *in vitro* Komplementationen ergänzt und somit die Auswirkungen eindeutig belegt werden.

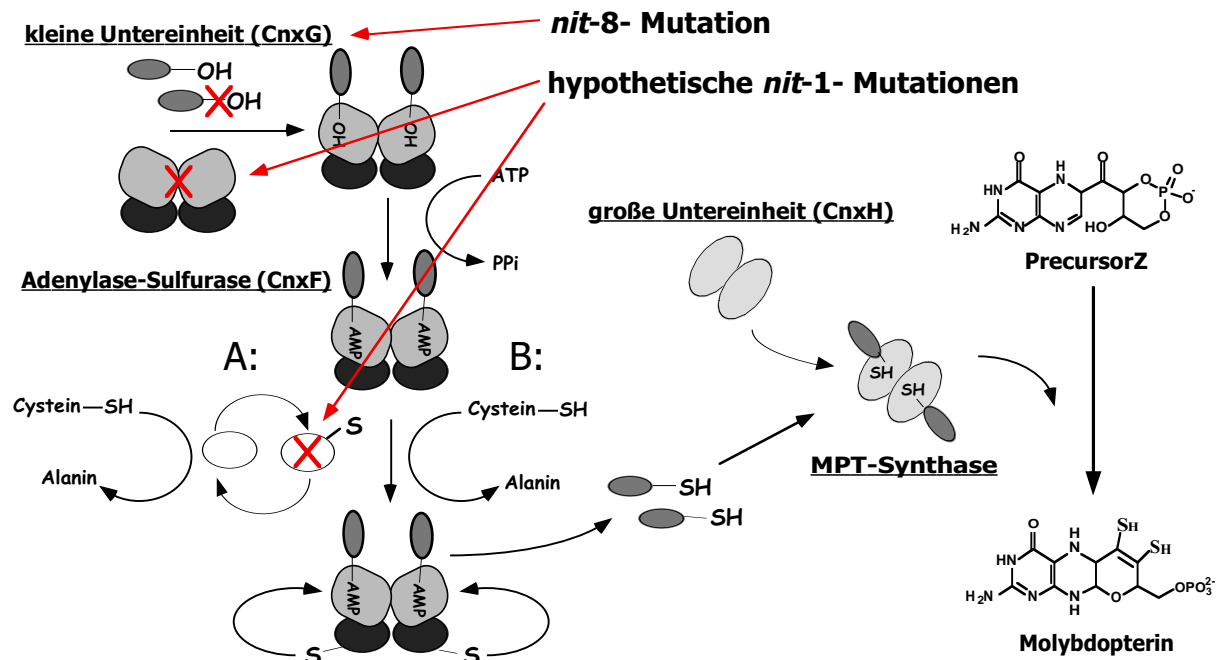


Abb. 3.14 Auswirkungen der identifizierten Mutationen in *nit-1* und *nit-8*

In *nit-8* ist die kleine Untereinheit durch Leserasterverschiebung defekt. In *nit-1* ist die Auswirkung der identifizierten Mutation im ersten Intron fraglich, weitere hypothetische Möglichkeiten sind nicht auszuschließen.

3.4 Bedeutung dieser Arbeit für die Aufklärung der MPT-Synthese

Die biochemische Charakterisierung der MPT-Synthase in Pro- und Eukaryonten brachte neue Einblicke in den Ablauf der Konversions-Reaktion von PrecursorZ zu MPT. Die hypothetische aktive Form der kleinen MPT-Synthase-Untereinheit als C-terminales Thiocarboxylat konnte sowohl für *E.coli*, als auch für *A.thaliana* und *H.sapiens* *in vitro* generiert und ihre Funktionalität gezeigt werden. Diese Ergebnisse lieferten die Grundlage zur Erstellung und Untersuchung eines hypothetischen Reaktionsmechanismus der MPT-Synthase. Grundsätzliche Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten scheinen hinsichtlich der Schwefelübertragung auf die kleine Untereinheit zu bestehen. Dies äußert sich in den eukaryontischen MoeB-Vertretern, die über ihre zu dem *E.coli* Protein homologe Adenylase-Domäne hinaus eine zusätzliche Rhodanese-Domäne besitzen und damit in die S-Übertragung involviert zu sein scheinen. Auch auf die Schwefelquelle ergaben sich im Laufe der Arbeit erste Hinweise, die Beteiligung der L-Cysteindesulfurase IscS an der S-Mobilisierung in

E.coli erscheint möglich, die signifikante Homologie eukaryontischer homologer Proteine macht eine funktionelle Beteiligung in Eukaryonten ebenfalls denkbar.

Die Identifizierung und Charakterisierung eukaryontischer Mutanten des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese liefert die Grundlage zur endgültigen Klärung der Frage nach konformellen Unterschieden zwischen pro- und eukaryontischem PrecursorZ.

4. Material und Methoden

Materialien

4.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Riedel de Häen, Merck, Sigma, Serva, Roth und BIO-Rad bezogen. Restriktionsendonukleasen sowie DNA- oder Protein-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Stratagene, Promega, Gibco/Brl Life Technologies, MBI fermentas und New England Biolabs.

4.2 Organismen und Stämme

Stamm	Referenz	Genotyp	Kultivierung/Verwendung
<i>E. coli</i> :			
MC4100	Casadaban, 1976	<i>F</i> Δ <i>lacU196 araD139 rpsL150 relA1 ptsF rbsR flbB</i>	LB, 37°C / WT-Mutantenkomplementation
DH5α	Hanahan, 1983 Bethesda, 1986	<i>supE4 Δlac U169 (Ø80lacZΔM15) hsd R17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	LB, 37°C / Klonierung
RK4353	Stewart & Mac Gregor, 1982	<i>F araD139Δ(argF-lac)U169, deoC1, flb5201 gryA 219, relA1, rpsL150, nob-9, ptsF25</i>	LB, 30°C / WT-Mutantenkomplementation
RK5203	Reiss <i>et al.</i> , 1987	RK4353 <i>chlA203::Mu cts</i>	LB, 30°C / <i>moaD</i> ⁻ Mutantenkomplementation
RK5204	Rivers <i>et al.</i> , 1993	RK4353 <i>chlA204::Mu cts</i>	LB, 30°C / <i>moaE</i> ⁻ Mutantenkomplementation
KB2047	Rivers pers. Mitteilung	<i>F-thr, leu his pro arg thi ade gal lacY malE xyl ara mtl str Tr,λr</i>	LB, 37°C / <i>moaD</i> ⁻ Mutantenkomplementation
KB2050	Rivers pers. Mitteilung	<i>F-thr, leu his pro arg thi ade gal lacY malE xyl ara mtl str Tr,λr</i>	LB, 37°C / <i>moaE</i> ⁻ Mutantenkomplementation
MJ7 <i>chN</i>	Johnson & Rajagopalan 1987	<i>Δlac U169araD139 rpsL gyrA nonchN134</i>	LB, 37°C / <i>moeB</i> ⁻ Mutantenkomplementation
M15 (pRep)	Villarejo & Zabin, 1974	<i>Na^f Str^S rif^R, lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F recA⁺ uvr⁺</i>	LB, 37°C / Expression pQE-Vektoren
ER2566	Jack, W., <i>et al.</i> & Chong, S., <i>et al.</i> (1997)	<i>F λ⁻ fhuA2 [Ion] ompT lacZ::T7 geneI gal sulA11 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10 R (mcr-73::miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1 (TetS) endA1 [dcm]</i>	LB, 37°C / Expression pTYB-Vektoren
BL21 DE3	Simcox, 1994	<i>F, ompT, r_B⁻m_B⁻hsdS, gal (λcIts857, ind1, San7, nin5, lac UV5-T7 gene 1)</i>	LB, 37°C / Expression pET-Vektoren
CL100 <i>iscS</i> ⁻	Lauhon <i>et al.</i> , 2000	<i>F araD139Δ(ara leu)7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM⁺ΔiscS strA</i>	LB, 37°C / <i>iscS</i> -Deletionsmutante
MC1061	M.Casadaban, 1980	<i>DE(araA-leu)7697, araD139([]), DE(codB-lac)3, galE15, galK16, LAM⁻, mcrA0, relA1, rpsL150 (strR), spoT1, mcrB9999, hsdR2</i>	LB, 37°C / WT- <i>iscS</i> -Mutante

Stamm	Referenz	Stamminformationen	Kultivierung/Verwendung
<u><i>N.crassa</i> :</u>			
<i>nit-1</i>	Perkins 1959 Genetics 44:1185-1208 Barratt <i>et al.</i> 1954. Adv. Genet. 6:1-93	FGSC Nummer: 32 bzw. 54, Genotyp: <i>nit-1</i> , Allel: 34547, Mating type: a bzw. A, Linkage group: IR, Genetic background: M, Mutagen: UV	<i>nit-1</i> Rekonstitutions-Assay, Mutantencharakterisierung
<i>nit-8</i>	Tomsett & Garrett, 1980	FGSC Nummer: 4236 bzw. 4237, Genotyp: <i>nit-8</i> , Allel: V1M44, Mating type: A bzw. a, Linkage group: IR, Genetic background: M, Mutagen: UV	Mutantencharakterisierung

4.2.1 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Verwendung
pBS II SK+	Short <i>et al.</i> , 1988	Klonierung
pTYB2	Chong <i>et al.</i> , 1997	Expression (Intein-Fusion)
pGEM-T-EASY	Promega	Klonierung
pQE60	Bujard <i>et al.</i> , 1987	Expression (His-Tag-Fusion)
pQE30, pQE32,	Bujard <i>et al.</i> , 1987	Expression (His-Tag-Fusion)
pET15	Novagen	Expression
pREP4	Farabaugh <i>et al.</i> , 1978	Expressionskontrolle

Diese Plasmide bilden die Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte und deren Subklone (siehe jeweilige Kapitel).

Methoden

4.3 Molekularbiologische Arbeiten

4.3.1 Klonierungstechniken

Zu den Arbeiten mit rekombinanter DNA auf Plasmidebene gehörte im wesentlichen die Neukombination von DNA, zur Klonierung von PCR-Amplifikaten und zur Expression von Genen in *E.coli*.

Der Einsatz aller DNA-modifizierenden Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Klenow-Fragment und alkalische Phosphatase, erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen in *E.coli* erfolgte nach Mandel und Higa (1979), die

dazu notwendigen kompetenten *E.coli* DH5 α -Zellen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Plasmid-DNA Minipräparationen wurden, je nach späterer Verwendung, entweder mit Hilfe der CTAB-Methode nach Del Sal (1989), der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) oder mit Hilfe verschiedener Kits (Nucleo-Spin Plasmid, Macherey & Nagel; Qia-prep Mini, Qiagen) durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989), DNA aus Agarosegelen wurde den Angaben der Hersteller entsprechend mit dem Easy-PureTM Kit von Biozym oder dem Nucleo-Spin Extract Kit von Macherey & Nagel aufgereinigt.

4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Aufgrund unterschiedlicher Anforderungen waren teilweise Abwandlungen vom Standardprotokoll nach Sambrook *et al.* (1989) und der Einsatz verschiedener DNA-Polymerase nötig. Für die Erstellung von Expressionkonstrukten wurde die Pwo-DNA-Polymerase eingesetzt (Hybaid; Peqlab). Für einfache Nachweis-Reaktionen konnte eine Taq-Polymerase eingesetzt werden (Promega; AGS-Gold, Hybaid), für RT-PCR Experimente wurde ein sehr prozessives und stabiles Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase verwendet (Proof-SprinterTM Kit, Hybaid). Für alle PCR-Experimente wurden die Thermocycler-Geräte Gen Amp PCR-System 2400 (Perkin-Elmer) bzw. PCR-Express Gradient (Hybaid) eingesetzt.

4.3.2.1 PCR-Mutagenese

Um gerichtete Mutationen in die Sequenz von *moaE* einzuführen und für die Erzeugung aller Expressionskonstrukte war es notwendig, an definierten Positionen Mutationen bzw. neue Restriktionsstellen die cDNA einzuführen. Hierzu wurden PCR-Amplifikationen mit mutagenisierenden Primern durchgeführt. In einem Volumen von 50 μ l erfolgt die PCR-Reaktion in Gegenwart von 1 μ M jedes Primers, 200 mM jedes Nukleotides, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 15-25 Zyklen, wobei einzelne Parameter wie Zyklenzahl, Annealingtemperatur und -dauer sowie Elongationszeit den jeweiligen Bedingungen angepaßt wurden. Das Standard-Protokoll für die Amplifikation von rekombinanter DNA setzte sich folgendermaßen

zusammen: einmalige Denaturierung bei 94°C für 1 min; 15-25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 2 min, abschliessende Endsynthese bei 72°C für 15 min.

4.3.2.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

In einer RT-Standardreaktion wurden 4-6 µg gesamt RNA eingesetzt. Diese wurde zunächst 3 min bei 65°C denaturiert bevor 5 µM Oligo-dT Primer, 20 U RNase-Inhibitor (rRNasin®, Promega), 500 mM eines jeden dNTPs und 10 U AMV-Reverse Transkriptase zu dem Gesamtansatz von 20 µl gegeben wurden. Die RT-Reaktion fand für 2 h bei 41°C statt und wurde anschließend mit TE-Puffer auf 250 µl aufgefüllt und somit abgestoppt. Die nachfolgende PCR wurde mit 0,5-3 µl der RT-Reaktion als Template, 2 µM jedes spezifischen Primers, 400 mM jedes dNTPs, 1,25 U Taq/Pwo-Gemisch in Gegenwart von 2,5 mM MgCl₂, 1/100 Volumen Tween 20 und 1/50 Vol. DMSO in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Für die Amplifikation wurde das Standardprotokoll den jeweiligen Ansprüchen angepaßt. Parallelproben wurden in einem Gradienten von unterschiedlichen Annealing-Temperaturen zwischen 50°C und 65°C in bis zu 50 Zyklen eingesetzt. Da in Gegenwart von Taq-Polymerasen hergestellte PCR-Amplifikate einen 3'-Adenin-Überhang besitzen, wurden RT-PCR Produkte direkt in einen TA-Vektor mit kompatiblen Thymin-Überhang (pGEM-T Easy™, Promega) kloniert.

4.3.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde hochreine über DNA-Isolationskits isolierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel; Qia prep Mini, Qiagen) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

4.3.4 GPS-M Mutagenese System (New England Biolabs)

Basierend auf der induzierbaren Insertion eines Transposons mit Chloramphenicol Resistenz-Kassette wurde die Ampicilin-Resistenz des pQE32 Vektors für die folgende Expression von *cnx5* zerstört. Die *in vitro* Transposition wird bei co-Inkubation des Zielvektors und dem transposon-tragenden Plasmid pGPS3 durch TnsABC Transposase induziert. Der Versuchsablauf wurde der Vorschrift (New England Biolabs) entsprechend durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden auf Chloramphenicol-Resistenz bei gleichzeitiger Ampicilin-Sensitivität gescreent und in Frage kommende Plasmide zur Insertions-Kontrolle sequenziert.

4.4 Proteinbiochemische Arbeiten

4.4.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

Für die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine wurde zum einen der Qiagen-Expressionskit (QIAexpressionist) verwendet, bei dem die Proteinaufreinigung durch eine Histidin-Tag vermittelte Bindung an NiNTA-Matrix ermöglicht wird, zum anderen wurde auf das Intein-System (IMPACT™-CN) der Firma New England Biolabs zurückgegriffen. Hierbei erfolgt die Proteinaufreinigung über eine proteinfusions-vermittelte Chitin-Matrix Bindung.

4.4.1.1 Aufreinigung von His-getaggten Proteinen

Für die Aufreinigung wurde die Niederdruck-Chromatographie-Anlage (Gradi-Frac, Pharmacia) eingesetzt. Die Arbeiten erfolgten bei 4°C. Alle verwendeten Puffer (siehe Qiaexpressionist) wurden vor Gebrauch entgast, die Absorption des Eluats wurde durch einen UV-Detektor (UV-1, Pharmacia) bei 280 nm verfolgt und aufgezeichnet. Die Überprüfung der Aufreinigung fand durch das Auftragen der gesammelten Proteinfractionen auf SDS-Polyacrylamidgele entsprechender Konzentration und Visualisierung über Coomassie-Färbung oder Antikörperdetektion statt. Anschließend wurden die Fraktionen zur Entfernung des Imidazols gegen 100mM Tris/HCl pH 6,0 - 8,0 (+100mM NaCl) dialysiert.

4.4.1.2 IMPACT™ CN-Intein-System

Das IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) System nutzt die induzierbare selbst-spaltende Aktivität eines Protein-splicing-Elements (Intein), um das Zielprotein vom Affinitätstag zu separieren. Das Zielprotein wird an einen Tag aus Intein und Chitinbindungsdomäne fusioniert und an eine Chitinmatrix gebunden. Das Intein katalysiert anschließend einen N-S-Acylshift der Peptidbindung an der Fusionsstelle zum Zielprotein, wodurch beide Domänen einen Thioester über die Cysteinseitenkette der ersten Intein-Aminosäure ausbilden. In Gegenwart von Thiolen wie DTT erfolgt die spezifische Selbstspaltung des Thioesters (ohne proteolytisch Spaltung) unter Freisetzung des nativen Zielproteins.

Die transformierten Stämme (ER2566) wurden aerob in LB-Medium bei 37°C angezogen, die Expression bei OD₆₀₀ = 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und die Expression für 15 - 20 h h bei 18°C fortgesetzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten 15 ml-Tropfsäulen wurden am Boden mit einer Fritte verschlossen und mit 5 ml Chitin-Matrix (Kapazität: 2 mg/ml) befüllt. Nach Absetzen der Matrix wurden diese mit einer weiteren Fritte bedeckt und die Säulen bei 4°C dem Protokoll entsprechend äquilibriert, beladen und nach Einsinken der Extrakte gewaschen. In Abwandlung des Originalprotokolls wurden dem Spaltungspuffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) alternativ entweder 50 mM DTT oder 50 mM (NH₄)₂S zugesetzt, um das thiocarboxylierte Protein zu generieren. Mit 2 Säulenvolumen dieses Puffers wurde gewaschen und die Säulchen für 16 – 24 Stunden bei 4°C bis zur Elution inkubiert. Das jeweilige Protein wurde durch sechsmalige Zugabe von je 1 ml Elutionspuffer eluiert und Aliquots jeder Fraktion in der SDS-PAGE mittels Trycin Gelen analysiert.

4.4.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen kleiner Volumina bis 2 ml erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren (Centricon 3 / 10, Amicon) mit einem Ausschlußvolumen von 3 und 10 kDa entsprechen den Angaben des Herstellers.

4.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes eines Rohextrakts erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von 5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H₂O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad; Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde.

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (1990) ermittelt.

4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 12,5% und 15% nach Laemmli (1970) bzw. 15% tige Trycin-SDS-Gele nach Schägger und Jagow (1987) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer (50% Glycerol; 3,5% SDS; 15% β-Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) versetzt und für 7 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei 150-200 V. Im Anschluß daran erfolgte eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel über eine Färbung mit Coomassie-Lösung.

4.4.5 Native Gelelektrophorese

Um das native Laufverhalten von MoaE und seinen generierten Mutanten zu analysieren, wurden nicht denaturierende SDS-freie Gele und Puffer benutzt und die Proben nicht durch Hitze- denaturiert.

4.4.6 Immunblot-Analyse

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (10% MeOH in 1x Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (HybondTM-P, Amersham/Pharmacia; Roti[®]-PVDF, Roth) wurden 4 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier

luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt bevor die Membran (zuvor mit MeOH benetzt, mit H₂O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert) und weitere 4 Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotten erfolgte für bei 250 mA mit 3 mA/cm². Nach Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) können die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5% in 1x TBS) angefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (2% BSA in 1x TBS) inkubiert bevor der 1:1000 in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei RT unter Schwenken wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen der Membran für je 8 min in TBSTXS (0,1% BSA; 0,1% Triton X-100; 0,05% SDS; in 1x TBS) und einmaliges Waschen für 10 min in 0,8% NaCl entfernt. An eine erneute 5-minütige Blockierung schloß sich die Inkubation mit dem sekundären mit Alkaliner Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) für weitere 1,5 h bei RT unter Schwenken an. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8% NaCl folgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 5 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl₂) nach Zugabe von 66 µl NBT/10 ml (Promega) und 33 µl BCIP/10 ml (Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

In dieser Arbeit wurde als primärer Antikörper der monoklonale Anti-His-Tag Antikörper aus Maus (Dianova) für die Arbeiten mit rekombinanten His-getaggten Proteinen verwendet.

4.4.7 Proteinsequenzierung

Eine N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung von überexprimierten und aufgereinigten Proteinen erfolgte über automatischen Edman-Abbau am Protein Sequencer ABI 473A bzw. ABI 494A Procise HAT (Applied Biosystems) in der GBF-Braunschweig. Ausgangsmaterial waren auf PVDF-Membran geblottete Proben von 20 – 200 pmol Protein.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist hoch reproduzierbar und kann daher auch zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck werden Eichgeraden mit Proteinen bekannter Größe erstellt.

Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde in dieser Arbeit die Superdex 200 HR 10/30-Matrix (Amersham/Pharmacia) verwendet. Die Gelfiltration wurde mit Hilfe einer Niederdruck-Chromatographieanlage (FPLC) von Pharmacia Biotech bei RT durchgeführt. Die mit *nit*-1-Puffer äquilibrierte Säule wurde jeweils mit 200 µl Probe (0,5 – 8 µM Protein) beladen und bei einer Flußrate von 0,3 ml/min separiert.

Zur MPT-Synthase Assemblierung wurden die kleine und große Untereinheit in molaren Ratios von 1:4 bis 4:1 für 5 Minuten co-inkubiert und in der Gelfiltration analysiert.

Für das Umpuffern bzw. Entsalzen von geringen Volumina in möglichst kurzer Zeit wurde die Gelfiltration an Sephadex G-25 und G-50 Matrices gewählt. Dabei kamen für Lösungen unter 400 µl vorgepackte Sephadex G-50 Nick-Säulen (Pharmacia) und für Volumina bis 2,5 ml vorgepackte Sephadex G-25 PD-10 Säulen (Pharmacia) zur Anwendung. Die Säulen wurden jeweils mit 5 Säulenvolumen des gewählten Puffers äquilibriert, mit der Probe beladen und die Differenz zum maximalen Probenvolumen an Puffer zugegeben. Die umgepufferte Proteinfraction wurde mit 5/4 Volumen des Probenvolumens eluiert.

4.5.2 Chemischer Nachweis von Intermediaten der Molybdäncofaktor-Biosynthese (FormA-Bestimmung)

Sowohl Molybdopterin (MPT) als auch der Molybdäncofaktor (Moco) selbst sind durch ihr Pteringerüst und die Dithiolen-Gruppe oxidationssensitiv und damit chemisch instabil. Aus diesem Grund findet der Nachweis über ein stabiles Oxidations-Derivat, das durch saure I₂/KI-Oxidation entstehende „FormA-dephospho“, statt. FormA kann direkt aus Moco oder seiner Vorstufe MPT generiert werden. Eine Unterscheidung dieser beiden Substanzen mittels FormA-Analyse ist nicht möglich.

Die saure Oxidation von MPT mit I₂/KI (1M HCl) führt zu dem stabilen Produkt FormA, das eine hohe Fluoreszenz aufweist. Da Fluoreszenzmessungen extrem sensitiv sind,

können auch geringere Mengen detektiert werden. Für die *in vitro* Versuche PrecursorZ zu MPT- zu konvertieren wurde dieser für 1 h mit assemblierter MPT-Synthase oder ihren Untereinheiten (1 μ M) inkubiert und das entstandene MPT als FormA dephospho detektiert. Für die Untersuchungen zu IscS wurden Zellextrakte analysiert.

Dazu werden 50 μ l einer wässrig sauren I₂/KI-Lösung in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 400 μ l MPT-enthaltender Lösung (Puffer für die Reaktion 100 mM Tris/HCl pH 7,2) aufgefüllt und für 30 min. bei 95°C inkubiert. Das ausgefallene Protein und andere Niederschläge werden durch 5 minütige Zentrifugation bei 12000xg pelletiert. Der Überstand wird in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, in dem 56 μ l einer frisch angesetzten Ascorbinsäurelösung (1% in ddH₂O) vorgelegt wurden. Durch Zugabe von 200 μ l 1 M Tris wird der pH-Wert der Lösung auf ca. 8,3 eingestellt und 6 μ l 1 M MgCl₂ zugesetzt. Anschließend werden 0,5 U einer alkalischen Phosphatase (AP)-Lösung (in 20 mM Tris/HCl pH 8,5 verdünnt) dem Ansatz zugegeben, was zu einer Abspaltung der terminalen Phosphat-Gruppe führt. Die folgende Reaktion sollte mind. 30 min. im Dunkeln inkubieren, kann aber auch über Tage oder Wochen fortgesetzt werden, da FormA-dephospho stabil ist.

Um FormA-dephospho in reiner Form zu erhalten, wird mit dem gewonnenen Extrakt eine isokratische Anionenaustausch-Chromatographie mit quartärem Aminoethyl (QAE) als Matrixmaterial durchgeführt. Das QAE-Sephadex A 25 Material (fine, Sigma) wurde nach Vorschrift in 1 M NaCl gequollen, in leere Nick-Säulen gefüllt (0,5 ml Matrixvolumen), mit ddH₂O mehrfach gewaschen und mit 1 M Ammoniumacetat in die Acetat-Form überführt. Die Matrix wird zunächst vor jeder Reinigung mit 1 M Ammoniumacetat 2x bis zur maximalen Säulenhöhe aufgefüllt, um eventuelle Rückstände zu entfernen und sie vollständig in ihre Acetat-Form zu bringen. Danach wird die Säule 3x bis zum oberen Rand mit filtriertem ddH₂O aufgefüllt. Jetzt erfolgt der Auftrag der Probe, nachdem diese noch einmal für 5 min. bei 12000xg zentrifugiert wurde, um eventuelle Präzipitate zu entfernen. Nach dem völligen Einsinken der Probe spült man die Säule mit filtriertem ddH₂O. Die Elution erfolgt isokratisch mit 10 mM Essigsäure, die ebenfalls vor Gebrauch filtriert wird. Zunächst wird ein Totvolumen von 2 ml auf die Säule gegeben. Nach vollständigem Einsinken wird die gebundene FormA-dephospho mit 2 ml 10 mM Essigsäure eluiert. Elutions- und Totvolumen sind von der jeweils eingesetzten Menge an abhängig und müssen vorher bestimmt werden. Die Probe kann nun an der HPLC analysiert, oder bei -20°C stabil gelagert werden. Ist die

Elution abgeschlossen, wird die Säule 2x mit Ammoniumacetat behandelt und kann in diesem Milieu belassen werden.

Zur Untersuchung und Quantifizierung der QAE-gereinigten FormA-dephospho Proben wird eine bekannte Menge auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 x 125 mm, Hypersil-ODS-Particle, 2,5 oder 5 μm) aufgetragen. Die Fraktionen werden gesammelt und mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert. FormA-dephospho weist ein charakteristisches Fluoreszenzspektrum auf. Bei 370 nm emittiert FormA-dephospho Strahlung bei 450 nm (Johnson *et al.*, 1984). In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Anlage der Agilent Technologies Serie 1100 benutzt. Die Flußrate betrug 1 ml/min. und das Ladungsvolumen 100 – 200 μl . Der Laufpuffer beinhaltete 90 % 50 mM NH_4 -Acetat und 10 % Methanol.

Zur Detektion und Quantifizierung der Proben wurde ein Fluoreszenzdetektor der HPLC 1100 Serie von Hewlett Packard genutzt. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte über die Chromatographie Software LC 3D Rev. A.08.03 (847), die die Fläche der detektierten Peaks (angegeben in relativer Fluoreszenz) integriert. Diese Fläche konnte anschließend durch einen Standard (FormA-dephospho, quantifiziert durch den molaren Extinktionskoeffizienten (Johnson *et al.*, 1984) quantifiziert werden.

4.5.3 Massen-Spektroskopie

4.5.3.1 Matrix- unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations-Massenspektroskopie (MALDI)

Die Massenspektren wurden mit einem Flugzeit (time of flight) Massenspektrometer (MALDI-TOF) von PerSeptive (Voyager DE-RP) ausgestattet mit einem Stickstoff-Laser (337 nm) aufgenommen. Die positiven Ionen werden auf 25 kV im Hochvakuum beschleunigt, an einem elektrostatischen Spiegel reflektiert und durch ein Konversiondynoden/Mikrokanal-Platten System detektiert.

Die Flugzeiten wurden gegen Standard-Proteine (Cytochrom c, Myoglobine und Angiotensin) unter Verwendung der selben massenspektrometrischen Parameter kalibriert. Die Matrix Proben wurden in einer gesättigten Methanol-Lösung von 2,4-dihydroxybenzol Säure und mit 9×10^{-5} bis 1×10^{-4} M der zu analysierender Lösung co-

kristallisiert, wobei jeweils 1 μL jeder Komponente pro Spot eingesetzt wurde. Die Spektren wurden über 20-50 Laser-Pulse erzeugt.

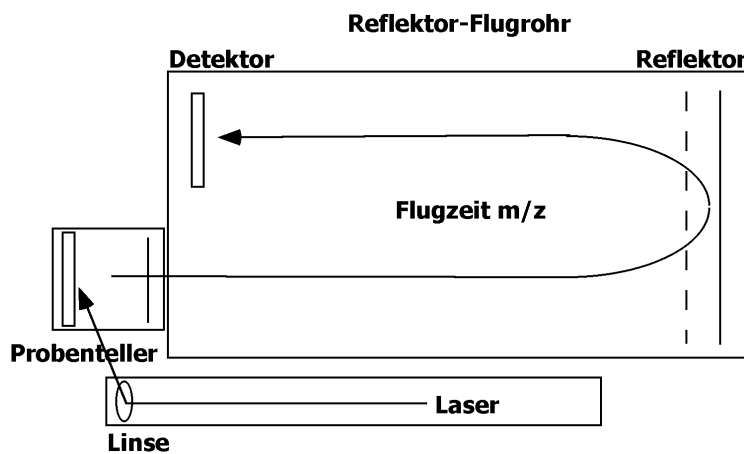


Abb. 4.1 Vereinfachtes MALDI Prinzip mit Reflektor-Flugrohr

Die Matrix-Kristalle werden mit einem Laser beschossen, verdampfen, fliegen in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell und lassen sich so zu unterschiedlichen Zeiten detektieren.

4.5.3.2 Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS)

Die Desolvatisierung der Ionen erfolgt durch kontinuierliche Zuführung des gelösten Analyten an die Spitze einer leitfähigen Kapillare. Das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen ähnlich wie bei der Elektrophorese. Bei ausreichend hohem elektrischen Feld ist der Flüssigkeitskonus stabil und emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom, dieser wird mit Entfernung zur Anode instabil und zerfällt, wobei die Oberfläche der entstehenden Tröpfchen je nach Polarisierung mit positiven oder negativen Ladungen angereichert ist, es tritt ein kontinuierlicher Lösungsmittelverlust durch Verdampfen auf, wodurch die Ladungsdichte der Oberfläche zunimmt. Es kommt zu einem spontanen Zerfall der Tröpfchen durch Coulomb-Explosionen und schließlich zur Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer.

In dieser Arbeit wurden das Esquire-LC 00081 der Lebensmittelchemie der TU-Braunschweig und das Esquire-LC 00153 der Analytischen-Chemie der Ruhr-Universität Bochum verwendet, die Zufuhr des Analyten erfolgte entweder direkt aus einer Spritze

bei konstanter Flußrate oder mit vorgeschalteter HPLC-Trennung an einer 150 mm C18-Säule nach isokratischer Auftrennung mit 2 % HAc. Die Ionen-Polarisierung war in unterschiedlichen Ansätzen alternativ negativ oder positiv.

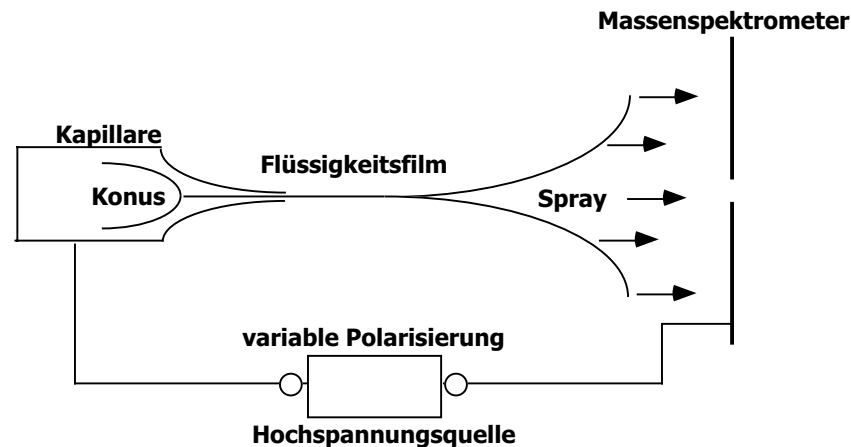


Abb. 4.2 Vereinfachtes ESI Prinzip

Mittels variabler Polarisierung sind Messungen im positiv- oder negativ Modus möglich.

4.5.5 Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der *E.coli* NR- Aktivität

Der qualitative Nachweis der NR-Aktivität in einzelner *E.coli*-Kolonien wurde mit Hilfe des „NR-Overlay“-Testes nach Lester & DeMoss, 1971 erbracht. Das Prinzip beruht auf der Induktion der Nitratreduktase durch anaerobes Wachstum, während der Kultur auf LB-Festmedium. Danach wird die Platte mit KNO_3 enthaltender Gellösung überschichtet und für 20 min. inkubiert. Über diese Schicht wird eine weitere gegossen, wobei das Produkt der Reduktion von Nitrat zu Nitrit mittels einer Farbreaktion nachgewiesen wird.

4.5.6 Benzviologen zur qualitativen Bestimmung der *E.coli* NR-Aktivität

Zur quantitativen Bestimmung der NR-Aktivität wird der *E.coli* Nitratreduktase Benzylviologen als artifizieller Elektronendonator angeboten. Um Benzylviologen in seine reduzierte Form zu überführen wird Natriumdithionit hinzugegeben. Benzylviologen weist im reduzierten Zustand eine charakteristische Violettfärbung mit Absorptionsmaximum bei 578 nm auf. Die Übertragung von 2 Elektronen des Benzylviologens auf die aktive NR ruft eine proportionale Abnahme der Färbung durch die Oxidation des Benzylviologens hervor.

Bei der Reaktion werden 2 mol Benzylviologen pro mol Nitrat umgesetzt. Zur Auswertung wird die Absorptionsabnahme in der Küvette vermessen. Mittels der Steigung, dem Küvettenvolumens, dem molaren Extinktionskoeffizienten von Benzylviologen, des Proteingehalts der Probe und der Schichtdicke der Küvette wird die Aktivität errechnet. Die Durchführung erfolgt nach MacGregor *et al.*, 1974.

4.5.7 PrecursorZ Aufreinigung

PrecursorZ wurde nach Protokoll von Wuebbens and Rajagopalan, 1993 aufgereinigt. PrecursorZ akkumulierende Zellen (*chlM*) wurden für 21h in LB Medium angezogen, geerntet und in 2,8 ml Wasser pro g Zellpellet resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte durch Zugabe von 34 µl 4M HCl pro ml. Nach Zentrifugation (14.000 rpm für 5 min), wurde der Überstand mit NaOH neutralisiert und auf ein Volumen von 2ml ankonzentriert. Die Reinigung erfolgte zuerst mittels HPLC Chromatographie an einer C18 Säule (5 mM NH₄Ac pH 5.0, 1 ml/min). Positive Fraktionen wurden mittels *nit-1* Assay identifiziert und durch Rotoevaporation auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Danach erfolgte eine Ionen-Austauscher Chromatographie an einer HPLC Partisil SAX Säule (10mM citrate; pH 3,0; 1,75 ml/min). Die positiven Fractionen wurden wiederum ankonzentriert auf ein Volumen von 2ml, der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7.2 eingestellt und Adsorption Spektren aufgenommen.

4.6 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

Zur genetischen Charakterisierung wurden die *chl-5* Mutante und ihr korrespondierender Wildtyp Wassilewskija (Ws) angezogen und genomische DNA isoliert.

4.6.1 Pflanzenanzucht und DNA-Isolation

In gut durchnässter Aussaaterde (z.B. frux oder Compo) werden 20-100 *Arabidopsis*-Samen in kleinen Plastik-Pflanztöpfen ausgebracht. Die Töpfe werden zum Schutz gegen vorzeitiges Austrocknen mit Frischhalte-Folie abgedeckt oder in ein Mini-Gewächshaus gestellt. Nach einer 1-2 Tage dauernden Keimungsinduktion bei 4°C werden die Samen in einen Kulturschrank mit definierten Anzuchtbedingungen überführt. Hierzu diente in dieser Arbeit ein AR-36L *Arabidopsis* growth chamber (Percival Scientific). Die Kultivierung erfolgte in der Regel zunächst für ca. 2 Wochen unter Langtagbedingungen. Als solche waren 16 h Lichtphase bei 22°C und 8 h Dunkelphase bei 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% bestimmt. Sobald die jungen Pflanzen ein kräftiges Rosettenstadium erreicht hatten, wurden Kurztagbedingungen eingestellt, die als 9 h Lichtphase bei 22°C und 15 h Dunkelphase bei 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% festgelegt waren.

Genomische DNA aus geerntetem Blattmaterial wurde nach Protokoll von Murray & Thompson, 1980 isoliert. Die erwartete Ausbeute an genomischer DNA aus 1 g Blattmaterial liegt bei 15-25 µg.

4.7 Arbeiten mit *Neurospora crassa*

4.7.1 Anzucht und Präparation der *Neurospora crassa nit*-Mutanten

Die *N. crassa* Stammkulturen wurden auf festem Fries-Medium (Mendel 1983), bis zur ausreichenden Bildung von Konidien, bei 25-30°C im Dunkeln kultiviert (Nason & Evans 1953; Heck 1995). Für die Anzucht von Mycel wurden die Konidien einer Kulturschale mit 5-10 ml sterilem ddH₂O vom Festmedium gespült und in 250 ml flüssigem Fries-Medium 85 mM NH₄Cl für 48 h bei 25°C unter Schütteln (150 rpm) im Dunkeln inkubiert. Nach der Kultur wurden die Zellen gefiltert, 3x mit sterilem ddH₂O gewaschen

und für 4 h in Fries-Medium überführt, dem 45 mM KNO₃ zugesetzt wurde und unter den gleichen Bedingungen weiterkultiviert, um eine Induktion der Nitratreduktase zu gewährleisten. Das geerntete Mycel wurde 3x mit ddH₂O gewaschen, anschließend getrocknet und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das homogenisierte Pulver wurde in 3 Volumen anaeroben Extraktionspuffer resuspendiert, dann homogenisiert und abschließend zentrifugiert, um in Aliquots bei -70°C gelagert zu werden.

4.7.2 Nachweis von MPT durch Komplementation der *nit-1* Mutante

Bei der *nit-1* Mutante (Sorger & Giles 1965) handelt es sich um eine NR-defiziente Mutante, die aktives NR-Apoprotein bildet. Da in dieser Mutante eine Mutation innerhalb des MPT-Synthase/Sulfurase-Komplexes vorliegt, kommt es zur Akkumulation von PrecursorZ (Johnson & Rajagopalan 1987a). In zellfreien Extrakten kann die NR-Aktivität durch externe Zugabe von aktiver MPT-Synthase und hohen Konzentrationen an Natriummolybdat, restauriert werden (Ketchum *et al* 1970; Nason *et al* 1970).

Dabei werden 50 µl Probe (MPT-Synthase-Quelle) mit 40 µl *nit-1* Extrakt, sowie 5 mM Molybdat und 5 mM Glutathion versetzt und der Ansatz 5 min. entgast und in einem mit N₂-gefüllten Exsikator für 2 h bei 25°C dunkel inkubiert. Anschließend wird dem Reaktionsgemisch 0,1 mg NADPH (0,2 mg / 100 µl *nit-1* Extrakt in 5 µl H₂O pro Probe) zugefügt und für 10-15 min. bei RT dunkel inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 Volumen Reaktionslösung (100 mM KNO₃ / 0,1 mM FAD (im Verhältnis 2:1)) wird die rekonstituierte NR induziert und für 30 min. bei RT weiter inkubiert. Das Abstoppen der Induktion erfolgt durch 5 minütiges Denaturieren bei 95°C und das gebildete Nitrit wird durch Zugabe von 250 µl 1% SA (in 3 M HCl) und 0,02 % NED bei OD₅₄₀ photometrisch quantifiziert.

4.7.3 Isolation von genomischer DNA aus *N. crassa*

Die Isolation von genomischer DNA aus Mycel erfolgte nach der für *A.thaliana* beschriebenen Methode von Murray & Thompson, 1980. In Abwandlung des Originalprotokolls wurde nach dem Zellaufschluß durch mörsern ein weiterer mechanischer Aufschluß durch 5 minütiges vortexen mit gewaschenen Glasbeads angeschlossen.

4.7.4 Isolation von gesamt RNA aus *N. crassa*

Die Isolation der *N.crassa* gesamt-RNA erfolgte nach *A.thaliana* Protokoll von Logemann, 1987 und mittels NucleoSpin RNA Kit von Macherey & Nagel.

5. Literaturverzeichnis

Aberg, B. (1974): On the mechanism of the toxic action of chlorates and some related substances upon young wheat plants. *Kungliga Lantbrukshögskolans Annaler* **15**: 37-107

Appleyard, M.V., Sloan J., Kana'n G.J., Heck I.S., Kinghorn J.R., Unkles S.E. (1998): The *Aspergillus nidulans* *cnxF* gene and its involvement in molybdopterin biosynthesis. Molecular characterization and analysis of *in vivo* generated mutants. *J Biol Chem.* **273(24)**:14869-76.

Alikulov, Z.A. & Mendel, R.R. (1984): Molybdenum cofactor from tobacco cell cultures and milk xanthine oxidase: Involvement of sulfhydryl groups in dimerization activity of cofactor. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **179**, 693-705.

Begley TP, Xi J, Kinsland C, Taylor S, McLafferty F.: The enzymology of sulfur activation during thiamin and biotin biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 1999 Oct;3(5):**623-9**. Review.

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001): ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276** (44), 40381-40384.

Bortels, H. (1930): Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffverbindung. *Arch Mikrobiol* **1**: 333-342.

Bogaart, A.M. & Bernini, C.F. (1981): The molybdoenzyme system of *Drosophila melanogaster*. I. Sulfite oxidase: Identification and properties. Expression of the enzyme in *maroon-like*, (*ma-l*), *low-xanthine dehydrogenase* (*lxd*) and *cinnamon* (*cin*) flies. *Biochem. Genet.* **19**, 929.

Bordas, J., Bray. R.C., Garner, C.D., Gutteridge, S. and Hasnain, S.S. (1980): X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms. *Biochem. J.* **191**, 499-508.

Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe₄S₄ cluster. *Science* **275**, 1305-1308.

Braaksma, F.J., & Feenstra, W.J. (1982): Isolation and characterization of nitrate reductase-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **64**: 83-90.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brown, G. M. (1985). in *Folates and Pterins* (Blakley, R. L., and Benkovics, S. J., eds) Vol. **2**, pp. 299-419, John Wiley & Sons, New York

- Cove, D.J.** & Pateman, J.A. (1963): Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **198**, 262-263.
- Cohen, H.J.**, Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J. Biol. Chem.* **246**, 374-382.
- Coughlan, M.P.** (1980): Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Pergamon Press. Oxford.
- Crawford, N.M.** (1992): Study of chlorate resistant mutants of *Arabidopsis*: insights into nitrate assimilation and ion metabolism of plants. In Setlow, J.K. (ed). genetic engineering, *principles and methods* vol **14**. Plenum Press New York: 89-98.
- Dunn-Coleman, N.S.** (1984): Biochemical characterization of the molybdenum cofactor mutants of *Neurospora crassa*: *in vivo* and *in vitro* reconstitution of NADPH-nitrate reductase activity. *Curr. Genetics* **8**, 581-588
- Eilers, T.**, Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R. and Mendel, R.R. (2001): Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276** (50), 46989-46994.
- Flint, D.H.**, Tuminello, J.F., Miller, T.J. (1996): Studies on the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* crude extract. Isolation of O-acetylserine sulfhydrylases A and B and beta-cystathionase based on their ability to mobilize sulfur from cysteine and to participate in Fe-S cluster synthesis. *J Biol Chem* **271(27)**: 16053-67.
- Finnerty, V.** (1976): Genetic units of *Drosophila* - simple cistrons. In: Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 1B, Chap. 18. Ashburner, M. and Novitski, E. (eds). New York: *Academic Press*, 721-765.
- Goto, M.**, Sakurai, A., Ohta, K., & Yamakami, H. (1969): The structure of urothione. *J Biochem* **65**: 611-620.
- Gutzke, G.**, Fischer B., Mendel R.R., Schwarz G. (2001): Thiocarboxylation of molybdopterin synthases provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem.* **276(39)**:36268-74.
- Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Gray TA**, Nicholls RD.: Diverse splicing mechanisms fuse the evolutionarily conserved bicistronic MOCS1A and MOCS1B open reading frames. *RNA*. 2000 Jul;**6(7)**:928-36.

Haenzelmann P, Schwarz G, Mendel RR. Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem.* 2002 Mar 12

Hasona A, Ray RM, Shanmugam KT.:Physiological and genetic analyses leading to identification of a biochemical role for the moeA (molybdate metabolism) gene product in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1998 Mar;**180(6)**:1466-72.

Heck, I.S., Ninnemann H. (1995): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Neurospora crassa*: biochemical characterization of pleiotropic molybdoenzyme mutants nit-7, nit-8, nit-9A, B and C. *Photochem Photobiol.* **61(1)**:54-60.

Heck, I.S. (1995): Biosynthese des Molybdän-cofaktors in *Neurospora crassa*: Biochemische Charakterisierung der pleiotropen Mutanten *nit-7*, *nit-8*, *nit-9A*, B and C sowie Untersuchungen über den Zusammenbau der Nitratreduktase. Dissertation angefertigt an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen

Hille, R. (1996a): Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 397-404.

Hille, R. (1996b): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.

Hoff, T., Schnorr, K.M., Meyer, C., & Caboche, M. (1995): Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of Molybdenum co-factor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J Biol Chem* **270**: 6100-6107.

Johnson, J.L., Hainline, B.E., & Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J Biol Chem* **255**: 1783-1786.

Johnson, J.L. & Rajagopalan, K.V. (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6856-6860.

Johnson, J.L., Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V., & Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem* **259**: 5414-5422

Johnson J. L, Wuebbens MM, Rajagopalan KV.: The structure of a molybdopterin precursor. Characterization of a stable, oxidized derivative. *J Biol Chem.* 1989 Aug 15;**264(23)**:13440-7.

Johnson, J.L., Bastian, N.R. and Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum

cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1390-1394.

Joshi, M.S., Johnson, J.L., & Rajagopalan, K.V. (1996): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* *mod* and *mog* mutants. *J Bacteriol* **178**: 4310-4312.

Kamdar, K.P., Shelton, M.E., & Finnerty, V. (1994): The *Drosophila* molybdenum co-factor gene *cinnamon* is homologous to three *Escherichia coli* co-factor proteins and to the rat protein Gephyrin. *Genetics* **137**: 791-801.

Ketchum, P.A., Cambier, H.Y., Frazier III, W.A., Madansky, C.H., & Nason, A. (1970): *In vitro* assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of *Neurospora* mutant and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**: 1016-1023.

Kinsland C, Taylor SV, Kelleher NL, McLafferty FW, Begley TP.: Overexpression of recombinant proteins with a C-terminal thiocarboxylate: implications for protein semisynthesis and thiamin biosynthesis. *Science*. 1998 Aug;**7(8)**:1839-42.

Kisker, C., Schindelin, H. and Rees, D.C. (1997): Molybdenum cofactor containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.

Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789.

Kuper J, Palmer T, Mendel RR, Schwarz G.: Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1G from *Arabidopsis thaliana* define functions for molybdopterin binding, molybdenum insertion, and molybdenum cofactor stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;**97(12)**:6475-80.

Kraemer, E., Wang J., Guo J., Hopkins S., Arnold J. (2001): An analysis of gene-finding programs for *Neurospora crassa*. *Bioinformatics* **17(10)**:901-12.

Kramer, S.P., Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan, K.V. (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 16357-16363.

Lake, M.W., Wuebbens M.M., Rajagopalan K.V., Schindelin H. (2001): Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* **414(6861)**:325-9.

Lauhon, C.T., Kambampati, R. (2000): The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem* **275(26)**: 20096-103.16:

Leimkühler S, Angermüller S, Schwarz G, Mendel RR, Klipp W.: Activity of the molybdopterin-containing xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high molybdenum concentrations in a *moeA* mutant defective in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol.* 1999 Oct; **181(19)**:5930-9.

Leimkühler, S., Rajagopalan, K.V. (2001): A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276(25)**: 22024-31.

Leimkühler, S., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. (2001): Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of MPT synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J Biol Chem* **44(16)**:2675-8.

Liu MT, Wuebbens MM, Rajagopalan KV, Schindelin H.: Crystal structure of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2000 Jan 21; **275(3)**:1814-22.

Maniatis, T., Fritsch, T.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Menendez C, Otto A, Igloi G, Nick P, Brandsch R, Schubach B, Bottcher B, Brandsch R.: Molybdate-uptake genes and molybdopterin-biosynthesis genes on a bacterial plasmid--characterization of MoeA as a filament-forming protein adenosinetriphosphatase activity. *Eur J Biochem.* 1997 Dec 1; **250(2)**:524-31.

Mendel, R.R., (1983): Release of molybdenum co-factor from nitrate reductase and xanthine oxidase by heat treatment. *Phytochemistry* **22**: 817-819.

Mendel, R.R. (1992): The plant molybdenum co-factor (Moco)- its biochemical and molecular genetics. *Curr Top Plant Mol Biol* **1**: 11-16.

Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor of higher plants: Biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**: 399-405.

Mendel, R.R., Schwarz, G. (2002): Biosynthesis and Molecular Biology of the Molybdenum Cofactor (Moco). *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. **39** (im Druck).

Müller, A.J. & Mendel, R.R. (1989): Biochemical and somatic cell genetics of nitrate reductase in *Nicotiana*. In: Wray, J.L. and Kinghorn, J.R. (eds). Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. *Oxford University Press*: 166-185.

Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, N. (1997): Cysteine sulfinic desulfurase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem* **272(36)**: 22417-24.

Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., Esaki, N. (1999): A *nifS*-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine

lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* **274(21)**: 14768-72.

Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000): Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *Biochem (Tokyo)* **127(4)**:559-67.

Nason, A., Lee K.Y., Pan S.S., Ketchum P.A., Lamberti A., DeVries J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68(12)**:3242-6.

Nicholas, D.J.D., Nason, A., & McElroy, W.D. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. I. Effects of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *J Biol Chem* **207**: 341-351.

Nieder, J., Stallmeyer, B., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor biosynthesis: Identification of *A. thaliana* cDNAs homologous to the *E. coli* sulfotransferase MoeB. In: Cram, W.J., De Kok, L.J., Stulen, I., Brunold, C. and Rennenberg, H. (eds). Sulphur metabolism in higher plants: Molecular, ecophysiological and nutritional aspects. SPB Academic Publishers, Amsterdam 275-277.

Nieder, J. (1999): Identifizierung und Charakterisierung des *E. coli* moeB-Homologen *cnx5* in Pflanzen, funktionelle Analyse des eukaryontischen Genproduktes, sowie die Untersuchung der Einflüsse anderer Stoffwechsel auf die Molybdäncofaktor-Biosynthese. Dissertation, TU-Braunschweig.

Palmer, T., Vasishita, Whitty, W.P. and Boxer, D. (1994): Isolation of protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**, 687-692.

Palmer, T., Santini, C.L., Iobbi Nivol, C., Eves, D.J., Boxer, D.H. and Giordano, G. (1996): Involvement of *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 875-884.

Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M., & Roberts, D.B. (1964): A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**: 58-60.

Pienkos, P.T., Shah, V.K. and Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5468-5471

- Pitterle, D.M.** & Rajagopalan, K.V. (1993): Biosynthesis of molybpterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13499-13505.
- Pitterle, D.M.**, Johnson, J.L. & Rajagopalan, K.V. (1993): *In vitro* synthesis of molybpterin from precursor Z using purified converting factor. *J. Biol. Chem.* **262**, 13506-13509.
- Prior P**, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, et al. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*. 1992 Jun; **8(6)**:1161-70.
- Rajagopalan, K.V.**, & Johnson, J.L. (1992): The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* **267**: 10199-10202.
- Rajagopalan, K.V.** (1996): Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt, F. C. (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. ASM Press. Washington DC, 674-679.
- Rech, S.**, Deppenmeier, U. and Gunsalus, R.P. (1995): Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *J. Bacteriol.* **177**, 1023-1029.
- Reichert, D.A.** & Westerfeld, W.W. (1953): Isolation and identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *J. Biol. Chem.* **203**, 915-923.
- Reiss, J.**, Cohen, N., Dorche, C., Mandel, H., Mendel, R.R., Stallmeyer, B., Zabet, M.T., Dierks, T. (1998): Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat Genet* **20(1)**: 51-3.
- Reiss, J.**, Dorche, C., Stallmeyer, B., Mendel, R.R., Cohen, N., Zabet, M.T. (1999): Human molybdopterin synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum cofactor deficiency type B. *J Hum Genet* **64(3)**:706-11.
- Rieder C**, Eisenreich W, O'Brien J, Richter G, Gotze E, Boyle P, Blanchard S, Bacher A, Simon H.: Rearrangement reactions in the biosynthesis of molybdopterin-an NMR study with multiply ¹³C/¹⁵N labelled precursors. *Eur J Biochem.* 1998 Jul 1; **255(1)**:24-36.
- Rivers, S.L.**, McNairn, E., Blasco, E., Giordano, G. and Boxer, D.H. (1993): Molecular genetic analysis of the *moa* operon of *E. coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081.
- Romao, M.J.**, Archer, M., Moura, J.J.G., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R. (1995): Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigans*. *Science* **270**, 1170-1176.

Rudolph, M.J., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H.: (2001) Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nat Struct Biol* **8(1)**: 42-6.

Schwartz ,C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., Kiley, P.J. (2000): The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97(16)**: 9009-14.

Schwarz G, Boxer DH, Mendel RR.: Molybdenum cofactor biosynthesis. The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity *J Biol Chem*. 1997 Oct 24;**272(43)**:26811-4.

Schwarz G, Schulze J, Bittner F, Eilers T, Kuper J, Bollmann G, Nerlich A, Brinkmann H, Mendel RR.:The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell*. 2000 Dec;**12(12)**:2455-2472.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**, 1615-1619.

Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000): Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23 (4)**: 482-488.

Shah, V.K., & Brill, W.J. (1977): Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3249-3253.

Shanmugan, K.T., V. Stewart, R.P. Gunsalus, D.H. Boxer, J.A.Cole, M. Chippaux, J.A. DeMoss, G. Giordano, E.C.C. Lin und K.V. Rajagopalan (1992): Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3425-3454

Stallmeyer, B., Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., & Mendel, R.R. (1995): Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J* **8**: 751-762.

Stallmeyer, B. (1997): Isolierung und Charakterisierung einer cDNA aus *Arabidopsis thaliana*, die die *E.coli* Molybdäncofaktormutante *mogA* funktionell komplementiert Dissertation, TU-Braunschweig.

Stallmeyer, B., Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L., Mendel R.R. (1999): Protein Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *J Hum Genet* **64(3)**: 698-705.

Stallmeyer B, Schwarz G, Schulze J, Nerlich A, Reiss J, Kirsch J, Mendel RR.: The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16; **96(4)**:1333-8.

Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE.: Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization *Nucleic Acids Res*. 2001 Mar 1; **29(5)**:1097-106.

Taylor, I.B. (1991): Genetics of ABA synthesis. In Davies, W.J. and Jones, H.G. (eds). Absciscic acid, physiology and biochemistry. *Bios Publishers*. Oxford: 23-37

Tomsett, A.B., Garrett R.H. (1981): Biochemical analysis of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*: evidence for autogenous control by nitrate reductase. *Mol Gen Genet*. **184(2)**:183-90.

Unkles, S.E., Heck I.S., Appleyard M.V., Kinghorn J.R. (1999): Eukaryotic molybdopterin synthase. Biochemical and molecular studies of *Aspergillus nidulans* *cnxG* and *cnxH* mutants. *J Biol Chem*. **274(27)**:19286-93.

Unkles, S.E., Smith J., Kanan G.J., Millar L.J., Heck I.S., Boxer D.H., Kinghorn J.R. (1997): The *Aspergillus nidulans* *cnxABC* locus is a single gene encoding two catalytic domains required for synthesis of precursor Z, an intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*. **272(45)**:28381-90.

Walker-Simmons, M., Kudrna, D.A. and Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol*. **90**, 728-733.

Wuebbens MM, Rajagopalan KV.: Structural characterization of a molybdopterin precursor. *J Biol Chem*. 1993 Jun 25; **268(18)**:13493-8.

Wuebbens, M.M., & Rajagopalan, K.V. (1995): Investigation of the early steps of molybdenum biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of *in vivo* labeling studies. *J Biol Chem* **270**: 1082-1086.

Wuebbens MM, Liu MT, Rajagopalan K, Schindelin H.: Insights into molybdenum cofactor deficiency provided by the crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC *Structure Fold Des*. 2000 Jul 15; **8(7)**:709-18.

Westerfeld, W.W., Richert, D.A. (1949): A new dietary factor related to xanthine oxidase, *Science* **109**: 68.

Xiang S, Nichols J, Rajagopalan KV, Schindelin H: The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure (Camb)*. 2001 Apr 4; **9(4)**:299-310.

6. Anhang

6.1 Primer

Tab. 6.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Nr.	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
			Klonierung von <i>cnx5</i> in pQE32
1	5' <i>cnx5</i> -pQE32-KpnI	TGGTACCCTAACATTGTCG	5' KpnI-Schnittstelle
2	3' <i>cnx5</i> -pQE32-HindIII	CAAAAAAGCTTCCCTCTAGTAGGTGGGGAAGT TGGGGTTGACATTGGCTGCCAAGCCTCCAG	Zerstörung der 3'internen HindIII-Schnittstelle und Generierung einer externen
			Intein und große Untereinheit :
3	Cnx7 intein KpnI	CGCCATTAAAACATTGGTACCCTTGGCAAACG ACCCGCCGCTTATCGGAGGTATGATGGC	
4	Intein rev sequence	ACCCATGACCTTATTACCAACCTC	Sequenzieren aus Intein
5	5' <i>cnx6</i> NcoI	GAAATTAACCATGGCTGCAGAGG	Cnx6 in pQE60
6	MoaE 5' NcoI	CGGAGGTTACCATGGCAGAAA	MoaE in pQE60
7	Cnx7-ATG NDEI pTYB2	GCTATCAGGTGCATATCGACAAAGAAG	5' Primer <i>cnx7</i>
8	Cnx7 Sequenz	GCTTGGAGAGGTACG	Sequenzierprimer
9	MoaD 5' NdeI	ACTTTAAGGTGGAAGCATATGATTAAAGTT	5' Primer MoaD
10	MoaD 3' KpnI	CGCCATTAAAACATTGGTACCCTTGGCAAAGC ACCCTCCCGGTTACCGCGGGAAGAAAGC	3' Primer MoaD
11			IscS plant und human
12	5' plant kurz NcoI	GAAAGGAGTTCGAACCATGGGTAAACCTCTTT ACTT	<i>A.thaliana</i> IscS
13	5' plant lead NcoI	GGTTTTAGAACCATGGCGTCTAAGGTAATC	<i>A.thaliana</i> IscS
14	3' plant –His BamHI	CAGTTTGAGTGGATCCGTTGAATCAGTG	<i>A.thaliana</i> IscS
15	3' plant +His BamHI	GAGTGGAAGTGTGGATCCAGTGTGAGACC	<i>A.thaliana</i> IscS
16	5' hum Lead SphI	GGGCTCTGCAGCGGAGCATGCTGCTCCGAGT CGCT	Human IscS
17	5' hum kurz SphI	GAGGTGGGGCCAGGCATGCGACCTCTCTATAT GGAT	Human IscS
18	3' hum +His BglII	GTCAGGGCCCAGATCTTCTGTGTTGGGTCCA C	Human IscS
19	3' hum –His BglII	GTCAGGGCCCAGATCTTCTAGTGTGGGTCCA C	Human IscS
			MoaE Mutagenese:
20	MoaE 5' F108-Ala	CGCAGCAGTGCGGCTGAAGCCGGG	Mutation: 5' F108-Ala
21	MoaE 3' F108-Ala	CCCGGCTTCAGCCGCACTGCTGCG	3' F108-Ala
22	MoaE 5' F96-Ala	GAAATCGTTGCTGTCGGTGCT	5' F96-Ala
23	MoaE 3' F96-Ala	GACACCGACAGCAACGATTTC	3' F96-Ala
24	MoaE 5' F34-Ala	GTAGTCACCGCTACTGGTAAGG	5' F34-Ala
25	MoaE 3' F34-Ala	CCTTACCAGTAGCGGTGACTAC	3' F34-Ala
26	MoaE 5' V15-Ala	GCCGTTTCAGCGCAGGAG	5' V15-Ala
27	MoaE 3' V15-Ala	CTCCTGCGCTGAACGGC	3' V15-Ala
28	MoaE 5' Q112-Glu	GAAGCCGGGAGTTTATTATGG	5' Q112-Glu
29	MoaE 3' Q112-Glu	CCATAATAAACTCCCGGCTTC	3' Q112-Glu
30	MoaE 5' Q112-Tyr	GAAGCCGGGTACTTTATTATGG	5' Q112-Tyr
31	MoaE 3' Q112-Tyr	CCATAATAAAGTACCCGGCTTC	3' Q112-Tyr
32	MoaE 5' M115- Ala	CAGTTTATTGCGGATTATCTC	5' M115- Ala
33	MoaE 3' M115- Ala	GAGATAATCCGCAATAAACTG	3' M115- Ala
34	MoaE 5' Q112-Ala	GAAGCCGGGCGTTTATTATGG	5' Q112-Ala
35	MoaE 3' Q112-Ala	CCATAATAAACGCCCGGCTTC	3' Q112-Ala
36	MoaE 5' Q112-Asp	GAAGCCGGGAAGTTTATTATGG	5' Q112-Asp
37	MoaE 3' Q112-Asp	CCATAATAAAGTCCCGGCTTC	3' Q112-Asp

38	MoaE 5' R104 - Ala	GTCACCACTGCGCATGCCAGCAGTG	5' R104 - Ala
39	MoaE 3' R104 - Ala	CACTGCTGGCATGCGCACTGGTGAC	3' R104 - Ala
40	MoaE 5' K37 - Ala	CCTTTACTGGTGCGGTGCGCAACCATAAC	5' K37 - Ala
41	MoaE 3' K37 - Ala	GTTATGGTTGCGCACCGCACCAGTAAAGG	3' K37 - Ala
42	MoaE 5' H103 - Ala	GTCACCACTGCGGCTCGCAGCAGTG	5' H103 - Ala
43	MoaE 3' H103 - Ala	CACTGCTGCGAGCCGCACTGGTGAC	3' H103 - Ala
44	MoaE 5' Y19 - Ala	GGAGAAGAGGCCCGTGGCTG	5' Y19 - Ala
45	MoaE 3' Y19 - Ala	CAGCCACGGGGCCTCTTCTCC	3' Y19 - Ala
46	Athal-chl5-5'cnx6		Mutagenese zu chl5-cnx6
47	Athal-chl5-3'cnx6	AACAGGAACTGGTCCAAAACGGTGAGCAAC	Mutagenese zu chl5-cnx6
48	MoaDCnx7 Fusion 3' moaD	CTTTAATTTCTCCTGATTTAAGAAGTGTGAC GCTTAACCTCCGGTTACCGCGGGAAGA	Fusionskonstrukt
49	Mocs2a 5' Întein	CGCTGTCCTAGGCCATATGGTGCCGCTGTGCC AGG	für pTYB2
50	Mocs2a 3' Întein	CCCATCCGCCATTAACAACTTGGTACCCTTGG CAAAGCATCCTCCACTAATGGGGCGGAT	für pTYB2
51	Mocs2b-Stop3'	GCTCTAAAAACAGATCTGATTAACCTTGATG CCC	bicistronisches Konstrukt
52	Mocs2a 5' EcoRI-RBS	CAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAA ATTAACATATGGTCCGCTGTGCCAGTT	bicistronisches Konstrukt
53	Mocs2a 3' EcoRI	CTTTCCTAGATGGCTCGAATTCATATCCTCC ACTAATGGGGGGGATAACGGCAATTCG	bicistronisches Konstrukt
54	klUE-pQE 5' Neurosp	CTGATTCAGGATCCCGATGAGCGCGCGAAAC C	Klonierung der kleinen Untereinheit in pQE32
55	cnx7-pQE 5' Neurosp	GTATCCCAAGCTTTTCCGCGGAGCTGACCGG	Klonierung der kleinen Untereinheit in pQE32
56	Neurosp gUE 5	CTAGTCATCAACCATGGCACTCAACAACC	Klonierung der großen Untereinheit in pQE60
57	NeurospgUE 3'	TTCCAGATCTGCTCTTCTATCATTTCCC	Klonierung der großen Untereinheit in pQE60
58	Neurosp-Sequ	CGCTCATCAAGAATCTAGTCATC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
59	Neurosp SequII	TTCCCTATCAGCTCTTCC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
60	Neurosp SequIII	GGTAGACAATGTCTGCATGTATCCC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
61	Neurosp SequIV	CAGTCTGACAGGATCTGATTCAC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
62	kl.UE-Neurosp 5' BamHI	GAATGAATGAATGGATGAATGAATG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
63	kl.UE-Neurosp 3' HindIII	CATCTTTTCGTCTACCTTTTGCTC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
64	gr.UE- Neurosp 5' NcoI	CGTTACTTTTCGGCCTACCGTTTCG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
65	gr.UE-Neurosp 3' BglII	CACCCCACTCAACGCCGCCGATC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
66	grUE-Neurosp sequenz 5'	GAGAGCCGAATTATGATTTTTTTTG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
67	gr.UE-Neurosp sequenz 3'	CGTCAAAAGACAGGACACACTGTG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
68	kl.UE-Neurosp sequenz 5'	GGTACCACCCGCAACAACCTTTAAC	Intron Eliminierung gr.UE
69	kl.UE-Neurosp sequenz 3'	GTAAAGTTGTTGCGGGTGGTACCGCAAA	Intron Eliminierung gr.UE
70	Neur.crassa moeB 5'1	CGGAAATCGATAACGGAGGG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
71	Neur.crassa moeB 5'3	CGCACTCCAACGTTTCAAATC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
72	Neur.crassa moeB 5'2	AGAGCGGGCATCTTGGGTC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
73	Neur.crassa moeB 5'4	CCTTTCCACAACTCCCTTG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
74	Neur.crassa moeB 5'5	GATCTGATTCACGATCCATATGAGCGCGCC	Klonierung der kleinen Untereinheit in pTYB2
75	Neur.crassa moeB 3'	CATTAAACATTGGTACCCTTGGCAAAGCA	Klonierung der kleinen Untereinheit in pTYB2
75	5' Intron grUE	GACCTGACAGTCCTGATGGATTTTTTTTTTT TTTT	Reverse Transkriptase-Reaktion
77	3' Fusion gr.UE	GACCTGACAGTCCTGATGGA	PCR mit cDNA
78	Neur.crassa moeB 5'1 neu	CGGAAATCGATAACGGAGGG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
79	Neur.crassa moeB 5'2 neu	CGCACTCCAACGTTTCAAATC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
80	Neur.crassa moeB 5'3 neu	AGAGCGGGCATCTTGGGTC	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
81	Neur.crassa moeB 3' neu	CCTTTCCACAACTCCCTTG	Sequenzierung der Mutanten <i>nit-1/nit-8</i>
82	Neur.crassa kl. UE 5'NdeI	GATCTGATTCACGATCCATATGAGCGCGCC	Klonierung der kleinen Untereinheit in pTYB2
83	Neur.crassa kl. UE 3'KpnI	CATTAAACATTGGTACCCTTGGCAAAGCA	Klonierung der kleinen Untereinheit in pTYB2
84	PolyT-BamHI-Anker	GACCTGACAGTCCTGATGGATTTTTTTTTTT TTTT	Reverse Transkriptase-Reaktion
85	BamHI-Anker	GACCTGACAGTCCTGATGGA	PCR mit cDNA

6.2 Sequenzen

Folgende genomische Nukleotidsequenzen der drei Wildtypproteine des zweiten Schritts der Moco-Biosynthese wurden identifiziert und sequenziert.

```

Frame 3   E  R  A  E  T  P  K  G  S  F  Q  H  P  V  L  R  N  C
Frame 2   .  A  R  R  N  P  Q  R  V  I  S  T  S  C  T  S  Q  L
Frame 1   M  S  A  P  K  P  P  K  G  H  F  N  I  L  Y  F  A  T
          ATG AGC GCG CCG AAA CCC CCA AAG GGT CAT TTC AAC ATC CTG TAC TTC GCA ACT
                9          18          27          36          45          54

          .  L  P  H  R  Q  G  Y  G  S  T  T  G  A  A  T  L  A  E  T
          L  A  P  T  Q  A  R  I  W  K  H  Y  R  R  R  Y  P  C  G  N
          A  S  S  H  T  G  K  D  M  E  A  L  P  A  P  L  P  L  R  K
          GCT AGC TCC CAC ACA GGC AAG GAT ATG GAA GCA CTA CCG GCG CCG CTA CCC TTG CGG AAA
                63          72          81          90          99          108

          L  .  H  T  R  G  A  V  P  G  Y  S  R  S  G  A  .  S  Q  P
          S  L  T  H  S  R  S  G  T  R  V  F  E  K  R  C  L  I  T  A
          L  F  D  T  L  E  E  R  Y  Q  G  I  R  E  A  V  L  D  H  S
          CTC TTT GAC ACA CTC GAG GAG CCG TAC CAG GGT ATT CGA GAA GCG GTG CTT GAT CAC AGC
                123          132          141          150          159          168

          G  H  D  K  L  G  L  R  G  Y  A  E  Q  .  G  .  R  R  R  G
          W  S  R  .  T  W  A  T  W  I  C  R  A  V  R  M  K  T  A  R
          L  V  T  I  N  L  G  Y  V  D  M  P  S  S  E  D  E  D  G  E
          CTG GTC ACG ATA AAC TTG GGC TAC GTG GAT ATG CCG AGC AGT GAG GAT GAA GAC GGC GAG
                183          192          201          210          219          228

          .  R  Y  C  Y  P  R  R  G  R  G  G  Y  H  T  S  G  Q  L  R
          I  T  L  L  L  S  K  K  G  T  R  W  L  S  Y  L  R  S  A  P
          D  N  V  T  V  I  Q  E  G  D  E  V  A  I  I  P  P  V  S  S
          GAT AAC GTT ACT GTT ATC CAA GAA GGG GAC GAG GTG GCT ATC ATA CCT CCG GTC AGC TCC
                243          252          261          270          279          288

          L
          A
          G  .
          GGC TGA

```

Abb. 6.1 Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der kleinen Untereinheit.

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die Nukleotidsequenz über 100 Nukleotide. Der codierende Leserahmen für das translatierte Protein ist rot hervorgehoben (Frame 1).

Frame 3 G N S T T N P N R . F G S S S T A T
 Frame 2 W Q L N N Q P K P I I R L K L N R H
 Frame 1 M A T Q Q P T Q T D N S A Q A Q P P
 ATG GCA ACT CAA CAA CCA ACC CAA ACC GAT AAT TCG GCT CAA GCT CAA CCG CCA
 9 18 27 36 45 54

 N K P S K A H R D L R T R H L R S P H P
 K Q T Q Q S P P R S Q N P A S T . P S P
 Q T N P A K P T E I S E P G I Y V A L T
 CAA ACA AAC CCA GCA AAG CCC ACC GAG ATC TCA GAA CCC GGC ATC TAC GTA GCC CTC ACC
 63 72 81 90 99 108

 R P P Q L S I R Y R P S P L P R S W G H
 T T T S T I N P L . T E S A P Q K L G P
 H D H L N Y Q S V I D R V R S P E A G A
 CAC GAC CAC CTC AAC TAT CAA TCC GTT ATA GAC CGA GTC CGC TCC CCA GAA GCT GGG GCC
 123 132 141 150 159 168

 C C L C R F V H P S S S S S P T S V P S
 L L S L P V R S S L L L L L P H F C S L
 I V V F A G S F I P P P P P P P L L F P
 ATT GTT GTC TTT GCC GGT TCG TTC ATC CCT CCT CCT CCT CCT CCC CCA CTT CTG TTC CCT
 183 192 201 210 219 228

 . F H P L I P L K P I N . H T H P R Y H
 L I P S S H P I K T H Q L T H P P K V P
 L N S I L S S H . N P S T N T P T Q G T
 CTT AAT TCC ATC CTC TCA TCC CAT TAA AAC CCA TCA ACT AAC ACA CCC ACC CAA GGT ACC
 243 252 261 270 279 288

 P Q Q L . L P P C P A P L L Y L L C A P
 P A T T L T P S L S S T S P I P P M R P
 T R N N F N S L P V Q H L S Y T S Y A P
 ACC CGC AAC AAC TTT AAC TCC CTC CCT GTC CAG CAC CTC TCC TAT ACC TCC TAT GCG CCC
 303 312 321 330 339 348

 S F A H H V N H M P L H S H Q A R V E G
 . L C A P C . P Y A A P F S P S T G . R
 L A L R T M L T I C R S I L T K H G L K
 CTA GCT TTG CGC ACC ATG TTA ACC ATA TGC CGC TCC ATT CTC ACC AAG CAC GGG TTG AAG
 363 372 381 390 399 408

 D S D G T Q V R C G P H R R G K Y L D C
 G . R W Y T G . V W S P S E R K V S . L
 G I A M V H R L G V V P I G E E S I L I
 GGG ATA GCG ATG GTA CAC AGG TTA GGT GTG GTC CCC ATC GGA GAG GAA AGT ATC TTG ATT
 423 432 441 450 459 468

 C I I S P . T G G M E G G G R G V G G V
 L Y H L P I D R R H G G R G K R R W R S
 A V S S P H R Q A A W R A G E E A L E E
 GCT GTA TCA TCT CCC CAT AGA CAG GCG GCA TGG AGG GCG GGG GAA GAG GCG TTG GAG GAG
 483 492 501 510 519 528

 . S Q S G G V E A G G V W W R G G R G V
 V K P K W R C G S G R S L V A R G E G C
 C K A K V E V W K R E E F G G E G G V
 TGT AAA GCC AAA GTG GAG GTG TGG AAG CGG GAG GAG TTT GGT GGC GAG GGG GGA GGG GTG
 543 552 561 570 579 588

```

      E S . . G W C G G G . G . . A . D R Q R
      G E L I G M V R W G L R L M S L G . A K
      W R A N R D G A V G V K V D E P R I G K
      TGG AGA GCT AAT AGG GAT GGT GCG GTG GGG GTT AAG GTT GAT GAG CCT AGG ATA GGC AAA
           603           612           621           630           639           648

      G S G . E G G . G R Q R E R G K . . E E
      G K W M R R R M R A T A G T G E M I G R
      G E V D E K E D E G D S G N G G N D R K
      GGG GAA GTG GAT GAG AAG GAG GAT GAG GGC GAC AGC GGG AAC GGG GGA AAT GAT AGG AAG
           663           672           681           690           699           708

      L
      A
      S .
      AGC TGA

```

Abb. 6.2 Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der großen Untereinheit.

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die Nukleotidsequenz über 720 Nukleotide. Der codierende Leserahmen für das translatierte Protein ist rot hervorgehoben (Frame 1). Die Bestimmung der Lage des Introns erfolgt über Consensus-Sequenzen. Diese Signalsequenzen sind in der Nukleotidsequenz türkis markiert. Sie stellen den 5'-Beginn (GT) und das 3'-Ende (AG) des Introns dar. Der codierende Bereich ist zwischen den Positionen 191 und 289 durch ein 99 bp. großes Intron unterbrochen. Die Nukleotide des Introns sind in der Sequenz unterstrichen.

```

Frame 3   G R W D G L G T W L L W S V D C W G
Frame 2   W K V G G W V G D L V A L V G . L L G
Frame 1   M E G G M G W G L G C F G R L I V G
           ATG GAA GGT GGG ATG GGT TGG GGA CTT GGT TGC TTT GGT CGG TTG ATT GTT GGG
                9           18           27           36           45           54

      E . T N H D C L C L F E V S V W S . G T
      R V D E P . L F M F I R S I C L V L R D
      E S R R T M T V Y V Y S K Y L S G L E G
      GAG AGT AGA CGA ACC ATG ACT GTT TAT GTT TAT TCG AAG TAT CTG TCT GGT CTT GAG GGA
           63           72           81           90           99           108

      D T M . . C E E G E C K L V L R D D D A
      . Y D V M M . G G R V Q V G F K R R . C
      L I R C D D V R R A S A S W F . E T M M
      CTG ATA CGA TGT GAT GAT GTG AGG AGG GCG AGT GCA AGT TGG TTT TAA GAG ACG ATG ATG
           123           132           141           150           159           168

      D V G R V Q D V D . I E L N N V P A Y L
      R C W Q G S R C G L N R V E Q R A R V P
      Q M L A G F K M W T E S S . T T C P R T
      CAG ATG TTG GCA GGG TTC AAG ATG TGG ACT GAA TCG AGT TGA ACA ACG TGC CCG CGT ACC
           183           192           201           210           219           228

```

D . P Q L L P Q D . V M G R I D F . V E
R L T T I A S P G L S D G Q N . L L S G
S T D H N C F P R I E . W A E L T F E W
TCG ACT GAC CAC AAT TGC TTC CCC AGG ATT GAG TGA TGG GCA GAA TTG ACT TTT GAG TGG
243 252 261 270 279 288

P E I D N G G R . T C Q F L T A Y A R L
A G N R . R R E V N V P I S H R L R P P
S R K S I T E G G E R A N F S P P T P A
AGC CGG AAA TCG ATA ACG GAG GGA GGT GAA CGT GCC AAT TTC TCA CCG CCT ACG CCC GCC
303 312 321 330 339 348

R Y R G P S C V P R S . T G G L Q Q W S
P L Q G A E L C A K K L N W R A A A V V
S A T G G R A V C Q E V E L E G C S S G
TCC GCT ACA GGG GGC CGA GCT GTG TGC CAA GAA GTT GAA CTG GAG GGC TGC AGC AGT GGT
363 372 381 390 399 408

V G L I Q P Y D F I F S S T F C S F S F
S G V D S A L R F H L F V Y L L L I Q F
Q W G . F S P T I S S F R L P F A H S V
CAG TGG GGT TGA TTC AGC CCT ACG ATT TCA TCT TTT CGT CTA CCT TTT GCT CAT TCA GTT
423 432 441 450 459 468

M P L G L H M D D I H K G I W S Y I K E
H A S R I A Y G . Y T Q G N L V I Y Q R
S C L . D C I W M I Y T R E F G H I S K
TCA TGC CTC TAG GAT TGC ATA TGG ATG ATA TAC ACA AGG GAA TTT GGT CAT ATA TCA AAG
483 492 501 510 519 528

A E A Q C . V S K C . E C . D F I N Q E
G R S S M L G F Q V L R M L R F Y . S G
R Q K L N A R F P S A E N V E I L L I R
AGG CAG AAG CTC AAT GCT AGG TTT CCA AGT GCT GAG AAT GTT GAG ATT TTA TTA ATC AGG
543 552 561 570 579 588

V I N Q N Q S S S L I S L A I A A P H S
S N Q P E S I K L F D L T R D S C P A L
K . S T R I N Q A L . S H S R . L P R T
AAG TAA TCA ACC AGA ATC AAT CAA GCT CTT TGA TCT CAC TCG CGA TAG CTG CCC CGC ACT
603 612 621 630 639 648

L P T F L S L T R . L G T F Y V S H S N
A T Y L P I T D T V T G N F L C I A L Q
R Y L P S Y H . H G D W E L F M Y R T P
CGC TAC CTA CCT TCC TAT CAC TGA CAC GGT GAC TGG GAA CTT TTT ATG TAT CGC ACT CCA
663 672 681 690 699 708

V S N H L T P N T T R C R T A V P A Q T
R F K S S Y P K H N K M Q N G G A S S D
T F Q I I L P Q T Q Q D A E R R C Q L R
ACG TTT CAA ATC ATC TTA CCC CAA ACA CAA CAA GAT GCA GAA CGG CGG TGC CAG CTC AGA
723 732 741 750 759 768

K M A Q S A L S L G T R A G L L Q K T S
Q N G S I S S V P R D T S R P L T E D E
P K W L N Q L C P S G H E P A S Y R R R
CCA AAA TGG CTC AAT CAG CTC TGT CCC TCG GGA CAC GAG CCG GCC TCT TAC AGA AGA CGA
783 792 801 810 819 828

S I D T P A R . L Y L E W E K K V S T S
 L D R Y S R Q M I V P G M G K E G K H L
 A R . I L P P D D C T W N G K R R . A P
 GCT CGA TAG ATA CTC CCG CCA GAT GAT TGT ACC TGG AAT GGG AAA AGA AGG TAA GCA CCT
 843 852 861 870 879 888

S L T L L F G L P F V T P E P K . T N H
 I P N V T F R P T V R Y P . T K V N K P
 H P . R Y F S A Y R S L P L N Q S K Q T
 CAT CCC TAA CGT TAC TTT TCG GCC TAC CGT TCG TTA CCC CTG AAC CAA AGT AAA CAA ACC
 903 912 921 930 939 948

I . P T P P P F L S P A Q L R L I N A K
 H L T N T P T L S V P S P T S S Y Q R Q
 T S D Q H P H P F C P Q P N F V L S T P
 ACA TCT GAC CAA CAC CCC CAC CCT TTC TGT CCC CAG CCC AAC TTC GTC TTA TCA ACG CCA
 963 972 981 990 999 1008

V L I I G A G G L G C P A A Q Y I A G A
 S P H H R R R R P R L S R R A I H C R R
 K S S S S A P A A S A V P P R N T L P A
 AAG TCC TCA TCA TCG GCG CCG GCG GCC TCG GCT GTC CCG CCG CGC AAT ACA TTG CCG GCG
 1023 1032 1041 1050 1059 1068

G I G T I G I A D G D T V E R S N L H R
 R H R H Y R H R R R R H R R A F Q S A P
 P A S A L S A S P T A T P S S V P I C T
 CCG GCA TCG GCA CTA TCG GCA TCG CCG ACG GCG ACA CCG TCG AGC GTT CCA ATC TGC ACC
 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Q V G H S T S R I G Q S K V S S L I T H
 T S R P L H L S H R A V Q S L V P H H P
 D K S A T P P L A S G S P K S R P S S P
 GAC AAG TCG GCC ACT CCA CCT CTC GCA TCG GGC AGT CCA AAG TCT CGT CCC TCA TCA CCC
 1143 1152 1161 1170 1179 1188

L R G L N P L P T Y V A H T T H I T P L
 P S R P Q P T P H L R R S H H S H H P T
 T F A A S T H S P P T S L T P L T S P H
 ACC TTC GCG GCC TCA ACC CAC TCC CCA CCT ACG TCG CTC ACA CCA CTC ACA TCA CCC CAC
 1203 1212 1221 1230 1239 1248

N A A D L I S Q Y D L I L D C T D N P A
 Q R R R S D L T I R P H P R L H R Q P R
 S T P P I . S H N T T S S S T A P T T P
 TCA ACG CCG CCG ATC TGA TCT CAC AAT ACG ACC TCA TCC TCG ACT GCA CCG ACA ACC CCG
 1263 1272 1281 1290 1299 1308

T R Y L I S D V C V L L C K P L V S A A
 H P L P D L R R L R A P L Q T A C L G R
 P P A T . S P T S A C S S A N R L S R P
 CCA CCC GCT ACC TGA TCT CCG ACG TCT GCG TGC TCC TCT GCA AAC CGC TTG TCT CGG CCG
 1323 1332 1341 1350 1359 1368

S V Q T S G Q I I V L N C P P T P Q G Q
 F R A N L G A N H C P Q L P A Y A A G S
 L P C K P R G K S L S S T A R L R R R V
 CTT CCG TGC AAA CCT CGG GGC AAA TCA TTG TCC TCA ACT GCC CGC CTA CGC CGC AGG GTC
 1383 1392 1401 1410 1419 1428

L D G G P Y P P C Y R C C F K K P P P A
 T R W R S L P A L L P V L L Q E T A T S
 N S M A V L T R L A T G A A S R N R H Q
 AAC TCG ATG GCG GTC CTT ACC CGC CTT GCT ACC GGT GCT GCT TCA AGA AAC CGC CAC CAG
 1443 1452 1461 1470 1479 1488

N A Q L S C G E A G I L G P V V G L M G
 Q R P A L V R R S G H L G S R G R T D G
 P T P S S R A A K R A S W V P W . D . W
 CCA ACG CCC AGC TCT CGT GCG GCG AAG CGG GCA TCT TGG GTC CCG TGG TAG GAC TGA TGG
 1503 1512 1521 1530 1539 1548

V A Q A G E A I K I L A S A L H I P T T
 R G A G G G G H Q D S G F C A S H S Y Y
 A W R R R G R P S R F W L L R F T F L L
 GCG TGG CGC AGG CGG GGG AGG CCA TCA AGA TTC TGG CTT CTG CGC TTC ACA TTC CTA CTA
 1563 1572 1581 1590 1599 1608

T T T T T S P P A Q G V P R A A P V V E
 Y Y Y Y Y L S A S S R G A A G R A R G G
 L L L L L P L R Q L K G C R G P R P W W
 CTA CTA CTA CTA CTA CCT CTC CGC CAG CTC AAG GGG TGC CGC GGG CCG CGC CCG TGG TGG
 1623 1632 1641 1650 1659 1668

P T L L L Y S Y S L T S F L S P F T F R
 T Y V A A V L V L A D F F P V A L H F P
 N L R C C C T R T R . L L S C R P S L S
 AAC CTA CGT TGC TGC TGT ACT CGT ACT CGC TGA CTT CTT TCC TGT CGC CCT TCA CTT TCC
 1683 1692 1701 1710 1719 1728

A L K M A P R K K N C F A C G E G S K Q
 C F E D G A E K E E L R L W R G K Q A
 V L . R W R R E R R T A S L V A R E A S
 GTG CTT TGA AGA TGG CGC CGA GAA AGA AGA ACT GCT TCG CTT GTG GCG AGG GAA GCA AGC
 1743 1752 1761 1770 1779 1788

R L T L E G V K N G E P N Y D F F C G L
 K V D A G G G E E W R A E L . F F L W V
 K G . R W R G . R M E S R I M I F F V G
 AAA GGT TGA CGC TGG AGG GGG TGA AGA ATG GAG AGC CGA ATT ATG ATT TTT TTT GTG GGT
 1803 1812 1821 1830 1839 1848

G G G G P E K G V L S E E E R I T P R E
 G W W R A G K G G V V R G G E D H A K G
 W V V A G R K R G C C Q R R R G S R Q G
 TGG GTG GTG GCG GGC CGG AAA AGG GGG TGT TGT CAG AGG AGG AGA GGA TCA CGC CAA GGG
 1863 1872 1881 1890 1899 1908

F V E R V Q G K D G N G K G K K Y V V L
 V C G K G T R K G R Q W E R K E V C G A
 S L W K G Y K E R T A M G K E R S M W C
 AGT TTG TGG AAA GGG TAC AAG GAA AGG ACG GCA ATG GGA AAG GAA AGA AGT ATG TGG TGC
 1923 1932 1941 1950 1959 1968

D T R E K E H F S F G S I E G A V N L P
 G Y E G E G T F . L W E H R G G S . S A
 W I R G R R N I L A L G A S R G Q L I C
 TGG ATA CGA GGG AGA AGG AAC ATT TTA GCT TTG GGA GCA TCG AGG GGG CAG TTA ATC TGC
 1983 1992 2001 2010 2019 2028

```

      F  G  K  L  L  S  K  A  A  Q  L  K  R  S  G  E  T  P  K  V
I  W  .  V  I  E  Q  G  C  T  V  E  T  E  R  G  D  S  Q  G
H  L  V  S  Y  .  A  R  L  H  S  .  N  G  A  G  R  L  P  R
CAT TTG GTA AGT TAT TGA GCA AGG CTG CAC AGT TGA AAC GGA GCG GGG AGA CTC CCA AGG
      2043      2052      2061      2070      2079      2088

      G  D  I  L  P  P  E  I  Q  V  R  D  G  H  G  D  K  D  I  P
R  R  Y  S  T  A  R  N  P  G  P  R  R  T  W  R  Q  G  H  S
.  E  I  F  Y  R  Q  K  S  R  S  A  T  D  M  E  T  R  T  F
TAG GAG ATA TTC TAC CGC CAG AAA TCC AGG TCC GCG ACG GAC ATG GAG ACA AGG ACA TTC
      2103      2112      2121      2130      2139      2148

      I  Y  V  V  C  R  R  G  L  D  S  Q  E  A  V  E  K  L  K  E
H  I  R  G  L  .  K  R  A  G  L  A  G  G  G  G  K  V  E  G
P  Y  T  W  S  V  E  E  G  W  T  R  R  R  R  W  K  S  .  R
CCA TAT ACG TGG TCT GTA GAA GAG GGC TGG ACT CGC AGG AGG CGG TGG AAA AGT TGA AGG
      2163      2172      2181      2190      2199      2208

      M  G  L  D  N  G  G  S  R  K  I  V  D  I  A  G  G  M  K  A
D  G  A  .  .  W  R  E  Q  E  D  C  G  Y  C  R  G  N  E  G
R  W  G  L  I  M  E  G  A  G  R  L  W  I  L  P  G  E  .  R
AGA TGG GGC TTG ATA ATG GAG GGA GCA GGA AGA TTG TGG ATA TTG CCG GGG GAA TGA AGG
      2223      2232      2241      2250      2259      2268

      W  K  E  Q  V  D  P  S  F  P  Y  L  .
L  E  G  A  G  .  S  K  F  P  V  S  I
L  G  R  S  R  L  I  Q  V  S  R  I  Y
CTT GGA AGG AGC AGG TTG ATC CAA GTT TCC CGT ATC TAT AA
      2283      2292      2301      2310

```

Abb. 6.3 Wildtypnukleotidsequenz mit möglichen Leserastern der Adenylase-Sulfurase.

Auf genomischer Ebene erstreckt sich die Nukleotidsequenz über 2315 Nukleotide. Der codierende Leserahmen für das translatierte Protein ist rot hervorgehoben. Die Bestimmung der Lage der hypothetischen Introns erfolgt über Consensus-Sequenzen. Diese Signalsequenzen sind in der Nukleotidsequenz türkis markiert. Sie stellen den 5'-Beginn (GT) und das 3'-Ende (AG) des Introns dar. Der codierende Bereich wird zwischen den Nukleotidpositionen 156 bis 597 und 885 bis 990 von zwei Introns unterbrochen. Die Nukleotide der Introns sind in der Sequenz unterstrichen.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf-R. Mendel für seine Unterstützung und Förderung. Die überlassenen Freiräume und sein Vertrauen in mich, meine Forschungsergebnisse in St.Moritz und Oxford präsentieren zu dürfen, haben den Spaß am wissenschaftlichen Arbeiten immer aufrecht erhalten.

Für sein Interesse und die Bereitschaft das Zweitgutachten dieser Dissertation zu übernehmen danke ich Prof. Dr. Jürgen Bode.

Dr. Günter Schwarz danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit, die vielen guten Ideen und die hilfreichen Diskussionen.

Jochen Kuper hatte die gesamte Zeit nicht nur für jedes Computerproblem ein offenes Ohr, auf seine Hilfe war auch außerhalb der Arbeitsgruppe immer Verlaß. Meiner Diplomandin Andrea Freuer danke ich für die prima Zusammenarbeit und Ihre erfolgreiche Diplomarbeit. Antje Schulte danke ich für Ihre gelungene Studienarbeit und für die schöne gemeinsame Zeit im Labor. Die "aufmunternden" Sprüche von Thomas Eilers waren ein wesentlicher Bestandteil meiner Doktorarbeitszeit und genauso wichtig, wie so mancher gemeinsamer Kaffee und seine uneingeschränkte Unterstützung im Labor. Ebenso danke ich Andreas Matthies für seine Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit. Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen Tanja Otte, Mandy Bretthauer, Florian Bittner, Ute Nieländer, Petra Hänzelmann, Christine Hesberg und Silke Leimkühler danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und die freundschaftliche Laboratmosphäre, sie haben wie alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe dazu beigetragen, daß ich die Zeit meiner Doktorarbeit vermissen werde.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung, die weit über finanzielle Dinge hinausgegangen ist.